

Priscilla Barros Delben

**ESTUDO COMPARATIVO DE CARACTERIZAÇÃO ENTRE
CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS ISOLADAS DO
TECIDO ADIPOSE FACIAL E DO ABDOMINAL HUMANOS**

Dissertação submetida ao Programa de Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof.^a Dra. Andrea Gonçalves Trentin

Coorientadora: Prof.^ª Dra. Patricia Dillenburg Pilla

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barros Delben, Priscilla
ESTUDO COMPARATIVO DE CARACTERIZAÇÃO ENTRE
CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS ISOLADAS DO TECIDO
ADIPOSO FACIAL E DO ABDOMINAL HUMANOS / Priscilla
Barros Delben ; orientadora, Prof^a. Dra. Andrea
Gonçalves Trentin; coorientadora, Dra. Patricia
Dillenburg Pilla - SC, 2017.
121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Células-tronco adultas. 3. Tecido adiposo humano.
4. Caracterização comparativa. 5. Integridade
genética. I. Gonçalves Trentin, Prof^a. Dra. Andrea.
II. Dillenburg Pilla, Dra. Patricia. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. IV. Título.

Priscilla Barros Delben

TÍTULO: SUBTÍTULO (SE HOVER)

Esta Dissertação/Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
“...” e aprovada em sua forma final pelo Programa ...

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Corientadora
Universidade xxxx

Prof. xxxx, Dr.
Universidade xxxxxx

*Este trabalho é dedicado à minha
família.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, onde realizei minha graduação em Ciências Biológicas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), órgãos financiadores que possibilitaram a realização deste projeto de pesquisa e por proporcionar minha bolsa de mestrado.

A todos os profissionais da UFSC que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial à Simone que sempre me cumprimentava com um enorme sorriso e um sonoro “ Bom dia” ou “ Boa tarde”! Simone, sem você ninguém no laboratório poderia fazer nada e penso que isto é algo que todos deveriam estar bem cientes! E também ao Rodrigo por sempre me enviar bons materiais para ler e sempre à disposição para me ajudar com números!

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia - LAMEB I, em especial a técnica Vanessa que sempre foi muito gentil, eficiente, de prontidão e paciente.

Ao médico Rogério Gomes e a equipe do Hospital e Maternidade Ilha, por viabilizarem as coletas de amostras de pele e lipoaspirado humanas utilizadas nesta dissertação. E a todos os pacientes que aceitaram doar seus tecidos para este trabalho.

À minha orientadora e professora Andrea por todo apoio e paciência que teve comigo nestes últimos 7 anos que estou estagiando em seu laboratório. Foi uma honra trabalhar no LACERT e com a senhora todos estes anos. Graças a senhora pude trabalhar com algo que amo mais a cada dia! Obrigada também pelos conselhos que muitas vezes busquei utilizar fora no âmbito profissional, como a história dos 20% de energia! Obrigada também por servir como exemplo de força feminina!

À minha co-orientadora Patricia, por me ajudar a decidir o que realmente é importante para a minha vida e a importância de nunca deixar os outros se sobreporem ao que acho que deve ser, independentemente de sua posição profissional ou social. Aprendi muito contigo durante este mestrado, aprendizado este que irei levar para toda a minha vida.

Ao professor Ricardo, por ser um profissional tão apaixonado e empenhado com o que faz a ponto de contagiar a todos e levantar nossa moral mesmo quando os resultados obtidos não são os mais desejados!

Aos meus bons e sempre parceiros colegas do LACERT, dos quais muitos considero também grandes amigos: a Mai e a Adri (dupla cafezinho, dupla linda), a Jaque (sempre de boa, sempre do bem), Aru (a humorista de cachos lindos), a Talita (mestre dos mestres), a Di (sempre gentil), a Fer (nunca vou esquecer que quis me usar como exemplo em suas aulas de biologia!rs), a Alê (prometo buscar mais imagens de preguiça), a Bianca (sempre profissional e eficiente), ao Juliano (pelas dicas burocráticas), ao Petry (pelas ajudas clínicas), ao Matheus (por sua energia alto astral), ao Diego (que conquiste a França!), as novas ICs Jéssica e Ana Júlia, a Gi (por nossos papos) e finalmente a Helena (minha primeira parceira da “gordura”!), a noiva linda que é oposta em quase tudo de mim (principalmente por causa de sua falta de capacidade de sentir calor, rs.), mas que de cara desenvolveu um grande carinho.

Aos meus colegas e vizinhos de corredor de laboratório Grazi, Jaque, Cairé, Mari, Gabriel e Anderson! Obrigada por todo quebragelho que precisei de última hora, mesmo uma mão forte para abrir um recipiente às 21:00 da noite! Muitos experimentos meus dependeram desta forcinha!

Ao meu amigo jovem, mas de alma velha Pescador! Obrigada por todos os conselhos e por me ajudar a aprender ser mais observadora e tentar entender até o lado do vilão. Obrigada pela parceria no último semestre de aula, sem dúvida alguma teria desistido sem ti. Por todas as lembranças que se depositaram na minha região abdominal resultado de todas as guloseimas que comemos juntos! Você tem razão meu jovem amigo, um dia vamos dividir o Nobel juntos, independente se você estiver na Coreia e eu na Patagônia, Antártida ou qualquer lugar gelado, o Nobel será nosso!

À minha parceira de trabalho e grande amiga Camila. Obrigada pela sua participação direta neste trabalho ao me ajudar obter resultados indispensáveis. Também quero agradecer-lá por me mostrar a importância de manter um sorriso no rosto por mais longo e difícil que tenha sido seu dia. Foi muito gostoso, divertido e orgulhoso trabalhar contigo, mas foi mil vezes melhor saber que em consequência deste trabalho desenvolvemos uma amizade que não tenho a menor dúvida que será mantida por muitos anos, se depender de mim será por séculos e séculos! Fico feliz por saber que vamos ter “obrigatoriamente” mais alguns anos pela frente juntas no laboratório e estou muito honrada por ser sua coorientadora nesta nova etapa da sua vida acadêmica. Parabéns pela conquista amiga, você mereceu! Sei bem o quanto é guerreira, porém doce e da paz!

Aos meus amigos “ Irrelevantes” que são extremamente relevantes para mim! Obrigada, Dani (meu anjo da guarda), Andi (meu guru), May (meu eterno docinho), Gabi (só tu mesmo para dar duas fontes ao mesmo tempo de imensa fofurice – Felipe e Marcelo), Laura (que enfim me deu o bolo de copo!!rs), Tábata (parabéns a mais nova mamãe!) JG (guerreiro para um mundo melhor), Panda (fonte de dúvidas acadêmicas.), Grosi (meu pirata favorito), Gustavo (meu Spock romântico), Candi (gênio indomável), Tomás (astrônomo singular que foi clonado, rs.), a Mari (a eficiência em pessoa e aquela que sempre podemos pedir ajuda ciente que vai ajudar sempre!), a Fabis (minha parceira das piscinas) e a Liza. Liza e Fabis, graças as vocês duas, aos nossos encontros semanais eu me senti mais viva e disposta diante de tudo que ocorreu! Obrigada liza por sempre estar ao meu lado e mostrar que a amizade verdadeira ultrapassar e supera tudo! Nunca se esqueça que faz mesmo a diferença na minha vida minha comprida linda!

As minhas grandes amigas que o LACERT me proporcionou Camila, Pati e Fer Melo! Obrigada por todo apoio durante o mestrado! Foram essenciais! Saudades de ver você no lab todos os dias Cami e de ter você Fer, minha eterna “ chefinha”, como co-orientadora! Que bom que não me abandonaram. E que bom Pati que vou poder te ver com mais frequência nos próximos dois anos!

E por fim e mais importante, quero agradecer a minha família. Sei o quanto é comum todos dizerem “ minha família é a melhor do mundo”, mas realmente a minha família (Barros Delben) é a melhor do mundo. Amo sair, encontrar com meus amigos, trabalhar no laboratório e outros, mas nada, nada me deixa mais feliz que voltar para minha casa, encontrar as 6 pessoas e meia que fazem valer a pena respirar, comer e continuar vivendo! Eu não tenho pretensão de voar longe para ter sucesso na vida ou ter rios de dinheiro sem não for para estar com vocês: mamãe, papai, Paola, Guilherme, Vic, Natasha e Anúbis (meu gato)! Há quem me julgue por ser tão apegada a vocês, mas sou eu quem julga o que é melhor para mim e sinceramente não consigo viver sem a minha família. Tudo que faço, tudo que penso, tudo que almejo é para tentar me manter o mais tempo possível com vocês. É graças a minha família que consigo recuperar minhas forças e me manter forte para encarar o próximo dia. Sem meu gato Anúbis, que sempre sabe a hora certa de sentar no teclado do meu notebook, não descansaria meus dedos e mente. Sem minha irmã Paola, não sentiria o orgulho e exemplo de como alcançar objetivos tão difíceis como chegar na Antártida, NASA, Marte e o que mais desejar explorar! Sem a dedicação do meu irmão Guilherme (motivo de muitas risadas e descontração no dia a dia)

para ajudar a ter o mínimo de condições financeiras jamais poderia me dedicar ao laboratório como fiz. Sem a minha irmã Tashinha (Natasha), que como meu mano é extensão de nossos pais, seria difícil seguir adiante com tantas palavras de apoio e carinho, além desta mana ter um humor que te faz dar gargalhadas mesmo quando você quer chorar! Sem minha irmã caçula e gêmea atrasada Vic teria tido um colapso nervoso já que foram graças suas massagens, exercícios de relaxamento e afins que impediram isto acontecer depois de incontáveis dias longo e estressantes! E principalmente não teria conseguido fazer este trabalho sem as duas pessoas que são as maiores responsáveis por quem sou! A minha mãe e o meu pai! Meus maiores conselheiros, meus heróis, maiores exemplos de vida e meu porto seguro (quem não tem portos seguros está à mercê da destruição cedo ou tarde). Obrigada por se dedicarem tanto, muitas vezes se anulando, para me dar as melhores condições possíveis para alcançar meus objetivos. Eu tenho muito orgulho e sou muito agradecida por ser filha e irmã desta família. Conseguir terminar este trabalho por causa de muitas pessoas envolvidas, mas acima de tudo porque tive estrutura psicológica e muito amor para dar conta e isto foi acima de tudo graças a minha família! Espero deixar vocês tão orgulhosos de mim como sou de você.

“ *Insufficient facts always invite danger*”
(Mr. Spock, Star Trek, 1966)

RESUMO

Uma grande vertente de estudos da biotecnologia é a utilização das células estromais mesenquimais (CEM) para terapias regenerativas. Entretanto, o sucesso da terapia celular com CEM é dependente da sua fonte de obtenção, da qualidade e da eficiência destas células, sendo uma das mais importantes, o tecido adiposo (TA) subcutâneo. Este tecido é de fácil obtenção, comumente obtido de excedentes descartáveis de procedimentos cirúrgicos amplamente realizados no mundo. No entanto, a grande maioria das pesquisas com CEM do TA (CEM-TA) são de origem do tronco e membros, sendo o TA facial pouco explorado com fonte destas células. O TA apresenta diversas distinções de acordo com sua deposição anatômica: origem embrionária, tipos, distribuição, funções e constituição tecidual. Estas diferenças podem influenciar nas características e eficiência terapêutica das CEM-TA. Tendo em vista estes aspectos, o presente trabalho buscou caracterizar comparativamente o perfil fenotípico e o potencial de diferenciação de células obtidas do TA facial e do abdominal humano. Também foi analisada a integridade celular visando investigar a segurança da sua aplicação terapêutica. Para isto, as CEM foram isoladas do TA facial e do abdominal humano, e suas características morfológicas e fenotípicas mesenquimais, bem como o potencial de diferenciação celular foram analisadas. Os resultados mostraram que ambas as CEM-TA apresentam morfologia fusiforme, aderência ao plástico e presença de marcadores específicos de células mesenquimais, porém, com algumas diferenças. As CEM-TA da face apresentaram maior expressão do marcador CD105 que as de abdômen, além de maior potencialidade para gerar osteócitos enquanto as CEM-TA do abdômen foram mais precoces no processo de gerar adipócitos. Após esta caracterização comparativa, foram avaliados o potencial de viabilidade/proliferação, de migração e a capacidade de formar unidade formadora de colônia fibroblástica (Colony-forming unit-fibroblasts CFU-F, do inglês). Os resultados mostraram que ambas as CEM-TA são equiparadas no potencial de viabilidade e de migração celular, mas diferem na capacidade de proliferação e no potencial de formar CFU-F. As CEM-TA da face foram mais proliferativas e mostraram maior eficiência para formar CFU-F do que as CEM-TA obtidas do abdômen. Por fim, foram avaliadas a senescência e integridade genética. Os resultados mostraram que ambas as CEM-TA foram equiparadas em todas as ANÁLISES, entretanto, em passagens mais altas (p23-28) as células obtidas do abdômen demonstraram maior

instabilidade nuclear do que as CEM-TA da face durante a expansão celular. Em conclusão, presente trabalho isolou CEM do TA facial e do abdominal humano. A origem do TA influenciou nas propriedades das células, mas ambas são equiparadamente promissoras para terapias regenerativas. Por fim, o TA facial é uma fonte alternativa de CEM tanto ou mais eficiente do que o TA abdominal humano.

Palavras-chave: Tecido adiposo, Células-tronco mesenquimais, Tecido adiposo, Caracterização, Integridade celular.

ABSTRACT

A major theme of biotechnological studies is the use of mesenchymal stromal cells (MSCs) for regenerative therapies. However, the tissue source is fundamental for the success of cell therapy with MSCs as well as their quality and efficiency. A well-known source of these cells is the subcutaneous adipose tissue (AT) which is easy to obtain and is a large reservoir of MSCs. Most studies obtain MSCs from AT (denominated in this study as MSC-AT) originated from trunk and members. AT has several differences depending on its anatomical location and embryonic origin, its types, distribution, functions and tissue constitution that might influence the characteristics and therapeutic efficiency. Therefore, the present study aimed to compare and characterize the phenotypic profile and potential cell differentiation of human facial and abdominal MSC-AT. Cellular integrity was also assessed to ensure safety of therapeutic applications. MSCs were isolated from facial and abdominal AT disposal after plastic surgeries and patient agrément. After cultured their morphological and phenotypical characteristics were analyzed, as well as the cell differentiation potential. Both facial and abdominal MSC-AT showed fusiform morphology, adhesion to plastic and mesenchymal markers. Facial MSC-AT showed a higher expression of CD105 marker and osteogenic potential than abdominal MSC-AT, in addition abdominal MSC-AT displayed premature adipogenic potential. Both facial and abdominal MSC-AT exhibited equivalent viability and cell migration potential, but were different in proliferation capacity and fibroblastoid colony forming units (CFU-F) potential. Facial MSC-AT were more proliferative and showed higher CFU-F efficiency than abdominal cells. However, in higher passages (p23-28), abdominal MSC-AT demonstrated higher nuclear instability than facial cells. In summary, the present study isolated MSCs from both facial and abdominal human AT, the origin of AT influenced some cell properties and facial AT is an important alternative source of MSCs.

Keywords: Adipose tissue, mesenchymal stromal cells, nuclear instability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais características das células-tronco. Células-tronco demonstram capacidade de autorreplicação por gerar outras células-tronco e capacidade de gerar fenótipos diferenciados como células epiteliais, neurônios, adipócitos, miócitos e célula. 27

Figura 2. Classificação e origem das células-tronco. As células-tronco podem ser classificadas como embrionárias e adultas (fetais e pós fetais). As embrionárias podem ser totipotentes ou pluripotentes e são encontradas do zigoto ao estágio de embrionária. ... 28

Figura 3. Células-tronco adultas. Células-tronco adultas são encontradas nos tecidos no estado quiescente até serem estimuladas a entrarem em divisão celular para gerar outras células-tronco e células progenitoras que vão se autorreplicar e gerar fenótipo célula tecido-específica. Fonte: Adaptado de (VISVADER, J. E. V & CLEVERS, H. 2016). 29

Figura 4. Ação das células-tronco na homeostasia tecidual. Quando ocorre uma lesão o microambiente sinaliza para as CT que atuam de forma direta gerando novos tipos celulares perdidos ou de forma indireta via secreção de fatores. 31

Figura 5. Composição, distribuição e tipos de TA. Composição celular, tipos de TA e de adipócitos. (A) O TA é altamente vascularizado e constituído por diversos tipos celulares como lipoblastos, macrófagos, fibroblastos e majoritariamente por adipócitos. (B) O TA é amplamente distribuído por todo o organismo podendo ser subcutâneo, visceral e ectópico (medula óssea, gônadas, musculo e pericárdico, dentre outros). (C) A principal célula constituinte do TA é o adipócito e este pode ser unilocular, multilocular e intermediário entre os dois caracterizando o TA em branco, marrom e bege, respectivamente. Fonte: Adaptado de (Ouchi, 2011). 36

Figura 6. Desenho esquemático da estrutura uniestratificada e disposição vertical do TA facial. Pele, TA e tecido muscular. O TA é um tecido intermediário entre a pele e a região muscular sendo constituído na face por uma única camada de adipócitos, contendo também algumas papilas do folículo piloso (anexo epidérmico) e atravessado por vasos e nervos do complexo musculo aponeuróticos do tecido muscular que alcançam até a pele. Fonte: Produzido pela autora (2017). 39

Figura 7. Desenho esquemático da estrutura biestratificada do TA abdominal. Esquematização da estrutura do TA subcutâneo abdominal e sua inserção entre os tecidos tegumentar e muscular. Pele

subjacente ao TA subcutâneo constituída pela epiderme e pela derme com seu anexo epidérmico (folículo piloso). Subjacente a pele há a região subcutânea contendo o TA subdividido em camada areolar e a camada lamelar, separadas pela fáscia superficial. Dentro da camada areolar existem bolsões de tecido conjuntivo delimitados por tecido conjuntivo fibroso e presença das papilas do folículo piloso na região mais superficial. Camada lamelar mostrando a disposição de adipócitos mais espaçados por matriz extracelular e separada da camada muscular pela fáscia profunda. Vasos e Nervos do complexo músculo-aponeurótico oriundos da região muscular atravessando a região subcutânea até atingir a pele. Fonte: Barros-Delben, 2017..... 41

Figura 8. Isolamento e expansão das CEM-TA.A fração vascular estromal (FVE) apresenta uma população heterogênea de células contendo adipócitos, pericitos, células endoteliais, hematopoiéticas, progenitores endoteliais e de adipócitos (lipoblasto) e CEM. Após algumas passagens ocorre uma homogeneização desta população que apresenta um perfil fenotípico mesenquimal (plasticidade célula, proliferação, migração, capacidade de formar unidade formadora de CFU-F, marcadores de superfície celular de células estromais mesenquimais e morfologia fusiforme com aderência ao plástico). Fonte: Adaptado de (SCHERBERICH, 2013)..... 43

Figura 9. Processos de obtenção de CEM do TA. O TA abdominal é comumente obtido pelos procedimentos cirúrgicos lipoaspiração (A) e abdominoplastia (B). Enquanto o TA facial pode ser obtido por meio de ritidoplastia facial. Fonte: Adaptado de (http://www.ifcsutahblog.com/2011_01_01_archive.html) 46

Figura 10. Procedimento de obtenção das CEM do TA e do tecido abdominal humano. TA obtido por excedentes de ritidoplastia facial (esquerda), n=3 mulheres entre 30-35 anos, e por excedentes de lipoaspirados abdominal (esquerda), n=3 mulheres entre 50-65 anos. O TA facial e abdominal é dissociado da pele ou da fração oleosa. Por meio de centrifugação é obtido o *pellet* celular contendo células isoladas do TA. Fonte: Fotografias obtidas pela autora (2016). 55

Figura 11. Rendimento de pellet celular de TA da face e do abdômen. Rendimento de TA da face (esquerda) e do abdômen (direita) após lavagem com PBS (A). Tamanho do *pellet* celular obtido do TA facial (esquerda) e do TA abdominal (direita). 63

Figura 12. Morfologia celular das células isoladas do TA facial e do abdominal. Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase das células aderentes derivadas da do TA facial (CEM-FA) e do abdominal (CEMAB) após 5 dias de semeadura. Ambas as

células foram aderentes ao plástico e mantiveram a morfologia fusiforme durante o cultivo. Escala representa 200 µm. 64

Figura 13. Caracterização imunofenotípica das CEM. Representação em histogramas de perfil imunofenotípico das amostras submetidas à citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD34-PE, CD45-FITC, CD90-FITC, CD73-PE, CD105-PerCP em um experimento representativo. As cores azuis representam as CEM-TA-FA e as cores vermelhas representam as CEM-TA-AB. CEM-FA: CEM -TA faciais; CEM-AB: CEM-TA abdominais. 65

Figura 14. Diferenciação adipogênica. Imagens representativas em microscópio de luz das CEM mantidas em meio indutivo adipogênico. Células com acúmulo de lipídio corado em vermelho com Oil Red aos 12 e 21 dias de tratamento. Inseto: controle (células mantidas na ausência do meio indutivo). Barra: 200 µm. CEM-FA: CEM -TA faciais; CEM-AB: CEM-TA abdominais. 66

Figura 15. Diferenciação osteogênica. Imagens representativas em microscópio de luz das CEM mantidas em meio indutivo osteogênico aos dias 21 e 28 de tratamento. Inseto: controle (células mantidas na ausência do meio indutivo). A matriz extracelular mineralizada é corada com Vermelho de Alizarina indicando a diferenciação osteogênica. Barra: 500µm. CEM-FA: CEM -TA faciais; CEMAB: CEM-TA abdominais. 67

Figura 16. Diferenciação condrogênica. Cortes histológicos dos *pellets* corados com Mallory. Barra: 1cm (A) e 50µm (B). CEM-FA: CEM -TA faciais; CEMAB: CEM-TA abdominais. 68

Figura 17. Capacidade de formar CFU-F. Fotomicrografias representativas de unidades formadoras de colônias (CFU-F) a partir de CEM isoladas do TA facial e do abdominal após 5 dias de cultivo celular em baixa densidade. Representação gráfica da eficiência das CEM do TA facial e do abdominal para formar CFU-F. Barra: 200 µm. 69

Figura 18. Migração celular. Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase de CEM-TA faciais (CEM-FA) e abdominais (CEM-AB) entre 0 e 21 horas após a lesão na monocamada celular (A). Representação gráfica da porcentagem de fechamento após 21 horas do procedimento de raspagem da monocamada. CEM-FA: CEM -TA faciais; CEM-AB: CEM-TA abdominais. Barra: 500 µm... 70

Figura 19. Perfil de senescência celular a longo tempo de cultura celular. Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase de CEM-TA faciais (CEM-FA) e abdominais (CEM-AB) durante a realização da curva de senescência celular. Surgimento e

aumento de células com alteração morfológica nas passagens 15 e p25, respectivamente. CEM-FA: CEM -TA faciais; CEM-AB: CEM-TA abdominais. Barra: 200 μm 71

Figura 20. Acúmulo de β -galactosidase ácida. Imagens representativas em microscópio de contraste de fase das CEM -TA faciais (CEM-FA) e abdominais (CEM-AB) após o ensaio de SA-b-gal. Células positivas coradas em verdes e sinalizadas por flechas vermelhas. Barra: 100 μm 72

Figura 21. Presença de γH2AX . Imagens representativas de imunocitoquímica para γH2AX (núcleos corados em verde) nas CEM-TA faciais e CEM-TA abdominais em passagens: baixa (p4), média (p15) e alta (p25). Barra: 50 μm e 200 μm na inserção..... 73

Figura 22. Anomalias nucleares avaliadas. Imagens representativas em microscópio de luz das anomalias avaliadas nas células tratadas com citocalasina B. Célula uninucleada (UN), célula binucleada (BI-NM), célula binucleada com ponte núcleo-citoplasmática (PNT) e células binucleada com broto (BT). Anomalias nucleares indicadas por fechos em vermelho. Aumento de 400x..... 75

Figura 23. Esquematização dos resultados obtidos das análises de CEM do TA facial e do TA abdominal. 78

Figura 24. Esquematização da hipótese sobre as propriedades de CEM isoladas do TA facial e do TA abdominal. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que há maior rendimento de TA e de fração celular de lipoaspirados abdominais do que de ritinoplastia facial (A). Em consequência disto, a fração celular do TA abdominal pode ser aplicada de forma mais imediata e menos custosa do que a fração celular do TA facial, no entanto esta última é mais rica em CEM (B). As características das CEM do TA facial e do TA abdominal diferem entre si, sugerindo uma população com mais propriedades de CEM do que as células obtidas do TA abdominal. Fonte: Fotos e imagens produzida pela autora (2017). 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados na análise fenotípica pelo ensaio de citometria de fluxo	56
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – Abdômen

ATP – Adenosina Trifosfato

BMP2 - *Bone morphogenetic protein 2* (proteína morfogenética 2)

BT- Broto Nuclear

CD34 - *Cluster of Differentiation 34* (antígeno de células progenitora hematopoiética)

CD45 – *Lymphocyte common antigen* (antígeno comum leucocitário)

CD73 – Ecto-5'-nucleotidase

CD90- Thy-1

CD105 - Endogлина

CEM – Células estromais mesenquimais

CEM – TA – Ab – Células estromais mesenquimais derivadas do TA abdominal

CEM – TA – Fa – Células estromais mesenquimais derivadas do TA facial

CFU-F - *Colony-forming unit-fibroblasts*

CT – Células-tronco

CTA – Célula-tronco adulta

CTA-CN – Células-tronco adulta da crista neural

CN- Crista Neural

DBS - *Double strand break* (Quebra de dupla fita da molécula de DNA)

DMEM – *Dulbecco's modified eagle medium*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EO – Estresse oxidativo

EROS - Espécies reativas de oxigênio

EUA – *United States of America* (Estados Unidos da América)

FA- Face

FGF- β - *Basic Fibroblast growth factors* (fator de crescimento de fibroblasto básico)

FITC- *Fluorescein isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)

FVE - Fração vascular estromal

IDN - Índice de divisão nuclear

LACERT – Laboratório de células-tronco e regeneração tecidual

HGF- *Hepatocyte growth factor* (fator de crescimento de hepatócito)

LAMEB – Laboratório Multiusuário de Estudo em Biologia

MEC – Matriz extracelular

MTT- (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil bromo tetrazólico)

PBS – Tampão fosfato salina

PDGF - *Platelet-derived growth factor* (fator de crescimento derivado de plaqueta)

PE- Ficoeritrina PE-Cy5: Ficoeritrina-cianina

PE-Cy5 - ficoeritrina-, -cianina 5

PNC – Ponte Nucleocitoplasmática

PS – Penicilina e estreptomicina

RL – Radicais livres

SBF – Soro bovino fetal

TA – Tecido adiposo

TA AB– Tecido adiposo abdominal

TA FA – Tecido adiposo facial

UFC-F – Unidade formadora de colônia fibroblastóide

TGF- β - *Transforming growth factor- β* (fator de crescimento transformador beta)

γ -H2AX – Gamma-H2AX

VEGF - *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. CÉLULAS-TRONCO.....	27
1.2. CÉLULAS-TRONCO ADULTAS (CTA).....	28
1.3. CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS (CEM)	31
1.4.APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS COM ESTROMAIS MESENQUIMAIS	32
1.5. TECIDO ADIPOSEO (TA).....	34
1.6. TA SUBCUTANEO FACIAL (TA FACIAL).....	38
1.7. TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO ABDOMINAL (TA ABDOMINAL)	40
1.8. CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS ISOLADAS DO TA HUMANO.....	42
1.9. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE TA PARA ISOLAMENTO DE CEM	44
1.10. SEGURANÇA NA MANUTENÇÃO DAS CEM <i>IN VITRO</i> : SENESCÊNCIA E INSTABILIDADE GENÉTICA.....	46
2. JUSTIFICATIVA.....	49
3. HIPÓTESE	51
4. OBJETIVO	51
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
5.1. DELENIAMENTO EXPERIMENTAL.....	53
5.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE TA HUMANAS.....	53
5.3. CULTURA PRIMÁRIA E ISOLAMENTO DE CEM DERIVADAS DO TA.....	54
5.4 ANÁLISES DO FENÓTIPO MESENQUIMAL	55
5.4.1. Análise morfológica e de adesão ao plástico por microscopia de contraste de fase	55
5.4.2. Ensaio de citometria de fluxo para análise da expressão de antígenos de superfície celular	56
5.5. DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPOS MESENQUIMAIS.....	57

5.5.1. Diferenciação adipogênica.....	57
5.5.2. Diferenciação osteogênica.....	57
5.5.3. Diferenciação condrogênica	57
5.5.4. Colorações.....	58
5.5.4.1. Coloração com Oil Red e Vermelho de Alizarina.....	58
5.5.4.2. Coloração de Mallory.....	58
5.5.5. Curva de diferenciação celular para os fenótipos adipocíticos e osteocíticos	59
5.6. ENSAIO DE VIABILIDADE/PROLIFERAÇÃO E FORMAÇÃO DE CFU-F.....	59
5.6.1. Ensaio de viabilidade/proliferação celular pelo teste de MTT	59
5.6.2. <i>Ensaio de proliferação celular (Cumulative doubling population).....</i>	<i>60</i>
5.6.3. Ensaio de formação de unidade formadora de colônia de fibroblasto (CFU –F).....	60
5.7. MIGRAÇÃO CELULAR	60
5.8 ANÁLISE DA SENESCENCIA E INTEGRIDADE GENÉTICA	61
5.8.1.Curva de Senescência celular.....	61
5.8.2. O ensaio de SA-b-gal (<i>Senescence Associated beta-gal</i>).....	61
5.8.3. Ensaio de Imunocitoquímica para γH2AX.....	61
5.8.4. Ensaio do bloqueio da citocinese pela citocalasina B.....	62
5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
6. RESULTADOS	63
6.1. 6.1. RENDIMENTO DE PELLET CELULAR POR AMOSTRAS DE TECIDOS DE TA DA FACE E DO ABDOMEN ...	63
6.2. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MESENQUIMAIS EM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS ISOLADAS DO TA FACIAL E DO ABDOMINAL	63
6.2.1. Morfologia e adesão celular	64
6.2.2. Presença de marcadores de fenótipo mesenquimal.....	64
6.2.3. Capacidade de diferenciação para fenótipos mesenquimais .	65

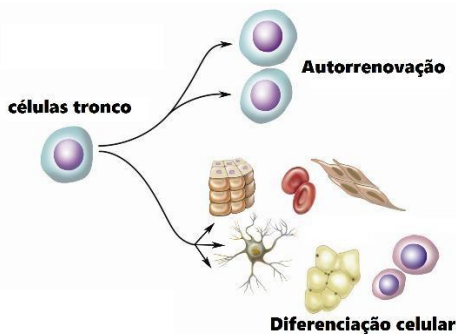
6.2.3.1. Curva de diferenciação para o fenótipo adipocítico	65
6.2.3.2. Potencial de diferenciação para o fenótipo osteocítico.	67
6.2.3.3. Potencial de diferenciação para o fenótipo condrocítico.....	68
6.3. ANÁLISE DA CAPACIDADE DE FORMAR COLONIAS FIBROBLASTOIDES (CFU-F).....	68
1.2 6.4 ANÁLISE DE MIGRAÇÃO CELULAR	69
6.5. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE CELULAR DURANTE A EXPANSÃO EM CULTIVO.....	70
6.5.1. Senescência celular.....	70
6.5.2. Integridade genética.....	72
7. DISCUSSÃO.....	77
7.1. O RENDIMENTO INICIAL DE OBTENÇÃO DE TA NÃO INTERFERE NO RENDIMENTO DE CÉLULAS APÓS EXPANSÃO CELULAR	78
7.2. INDEPENDENTE DA FONTE DO TA, FACE OU ABDÔMEN, AS CÉLULAS ISOLADAS DESTE TECIDO APRESENTAM CARACTERÍSTICAS DE CEM.....	80
7.3. AS CEM OBTIDAS DE AMBAS AS FONTES DE TA SÃO EQUIPARADAMENTE RESISTENTES A DANOS CELULARES. .	84
7.4. A ORIGEM DO TA (EMBRIONÁRIA OU REGIÃO ANATÔMICA) PODE INFLUENCIAR AS PROPRIEDADES DAS CEM DESTE TECIDO SEM REDUZIR O POTENCIAL TERAPÊUTICO DE AMBAS AS CÉLULAS	89
8. CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXO 1	105
ANEXO 2	107
ANEXO 3	108

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÉLULAS-TRONCO

O corpo humano é composto por aproximadamente 200 tipos de células tecido-específicas (Pera, Reubinoff, & Trounson, 2000), todas geradas a partir de células progenitoras que por sua vez são geradas de células-tronco (CT) (PERA *et al.*, 2000; YAMASHITA *et al.*, 2010). As CT são células indiferenciadas capazes de se autorrenovar ao gerar novas CT e também capazes de gerar fenótipos celulares especializados (Figura 1) (Dominici *et al.*, 2006).

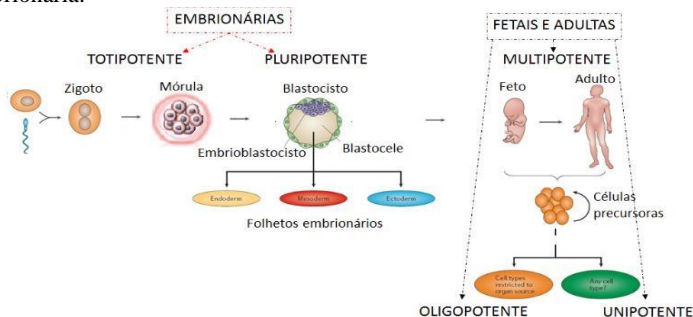
Figura 1. Principais características das células-tronco. Células-tronco demonstram capacidade de autorreplicação por gerar outras células-tronco e capacidade de gerar fenótipos diferenciados como células epiteliais, neurônios, adipócitos, miócitos e célula.



A primeira CT do organismo de mamíferos é o zigoto (resultante da fusão do óvulo com o espermatozoide), capaz de originar todos os tipos celulares que irão constituir o organismo além dos anexos embrionários (Behr *et al.*, 2010; Pera *et al.*, 2000). Portanto, o zigoto é uma célula totipotente (maior potencial de diferenciação celular ou plasticidade) (Condic, 2014). O potencial totipotente é observado nas células até o estágio de mórula (primeiro estágio da embriogênese) (Condic, 2014). Após esse estágio as células são denominadas de pluripotentes e formam os folhetos embrionários ectoderma (origina tecidos do sistema nervoso e tegumentar), endoderma (forma a mucosa gastrointestinal) e mesoderma (todos os tecidos conjuntivos, como a derme, o tecido adiposo e o tecido muscular) que são responsáveis por formar todos os tecidos fetais e pós-natais, excluindo os anexos embrionários (Condic, 2014; Martindale, Pang, & Finnerty, 2004; Pera

et al., 2000). Já nos tecidos fetais e adultos (pós-natais) as CT são classificadas como multipotentes e seu potencial de diferenciação celular está restrito ao folheto embrionário originário (Young; Black, 2004). Além dessas, nos tecidos maduros há CT com menor plasticidade, como as CT oligopotentes que geram tipos celulares de mesma linhagem (CT linfóides e mielóides do sangue) e as CT unipotentes que são capazes de gerar apenas um fenótipo especializado, também conhecidas como células progenitoras (Jung & Brack, 2014). Entretanto, há muito debate sobre a diferença do termo célula progenitora e CT, muitos autores os consideram como sinônimos. Neste trabalho serão considerados como distintos (Jung; Brack, 2014; Young; Black, 2004). Por fim, resumidamente, as CT são classificadas quanto a sua origem (embrionárias, fetais ou adultas) e seu potencial de diferenciação celular (totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes) (Behr *et al.*, 2010; Dominici *et al.*, 2006; Pera *et al.*, 2000) (Figura 2).

Figura 2. Classificação e origem das células-tronco. As células-tronco podem ser classificadas como embrionárias e adultas (fetais e pós fetais). As embrionárias podem ser totipotentes ou pluripotentes e são encontradas do zigoto ao estágio de embrionária.

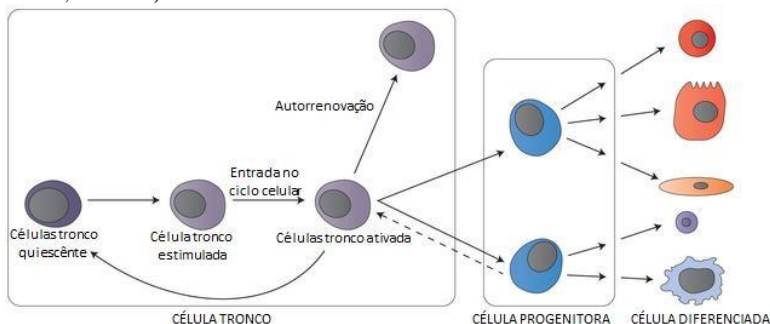


1.2. CÉLULAS-TRONCO ADULTAS (CTA)

As células-tronco adultas (CTA), também denominadas de CT somáticas, são encontradas em tecidos de fetos, de crianças e de adultos (Fukada, Ma, & Uezumi, 2014; Vessoni, Muotri, & Okamoto, 2012). Essas células demonstram menor capacidade proliferativa e de diferenciação celular que as embrionárias, ou seja, são multipotentes (Knoblich, 2008). Nos tecidos, as CTA encontram-se no estado quiescente (parada reversível do ciclo celular) até serem sinalizadas a retornar para o ciclo celular e dividirem-se por mitose (Knoblich,

2008; Yamashita *et al.*, 2010). Durante esse processo, estas células podem renovar a sua população gerando novas CTA e células progenitoras que irão originar fenótipos especializados para o tecido em questão (Yamashita *et al.*, 2010). Dessa forma as CTA renovam as células danificadas, as senescentes (envelhecidas) ou as perdidas (Fukada *et al.*, 2014). Para que as CT atuem no microambiente é necessária à sua interação com o seu nicho, como a matriz extracelular (MEC), moléculas solúveis ou aderidas a MEC e outras células (Dominici *et al.*, 2006; Jung & Brack, 2014). Assim, as CTA possibilitam a renovação e auxiliam no processo de reparo tecidual em resposta a uma lesão ou a distúrbios provocados por acidentes e patologias (Figura 3) (Jeremias *et al.*, 2014).

Figura 3. Células-tronco adultas. Células-tronco adultas são encontradas nos tecidos no estado quiescente até serem estimuladas a entrarem em divisão celular para gerar outras células-tronco e células progenitoras que vão se autorreplicar e gerar fenótipo célula tecido-específica. Fonte: Adaptado de (VISVADER, J. E. V & CLEVERS, H. 2016).



Apesar das CTA apresentarem menor capacidade proliferativa e de diferenciação celular que as embrionárias, elas também demonstram menor potencial para causar neoplasias e teratomas (tumor germinativo) (Sivakumar *et al.*, 2015). Além disto, para se obter CT embrionárias é necessário a destruição do embrião, o que resulta em muitos conflitos políticos, éticos e religiosos (Bydlowski, Debes, Maselli, & Janz, 2009). Por causa disso, diversos países proíbem o uso de CT embrionárias em pesquisas científicas (Pera *et al.*, 2000). Outro aspecto vantajoso das CTA é que estas são obtidas de vários tecidos de todos sistemas do organismo: tegumentar (epiderme, anexos epidérmicos e derme), sistema nervoso (cérebro), sistema circulatório (coração e vasos), sistema respiratório (pulmões), sistema gastrointestinal (estômago,

fígado e intestino), sistema excretor (rins e bexiga), sistema reprodutor (gônadas), sistema esquelético e sistema muscular (Fukada *et al.*, 2014). CT foram isoladas também da polpa dentária, do prepúcio e o do TA (Kaltschmidt, Kaltschmidt, & Widera, 2012; Sivakumar *et al.*, 2015). Portanto, há diversas fontes de CTA sem que a obtenção destas cause o comprometimento do desenvolvimento ou a viabilidade do doador. Ademais, as CTA apresentam menores conflitos éticos para sua obtenção, facilitando o seu estudo para diversos fins, como para as terapias regenerativas (Young; Black, 2004).

A terapia regenerativa é uma área da medicina que busca melhorar a capacidade do organismo em reparar tecidos e órgãos acometidos por lesões teciduais ou doenças graves como cardiopatias, neoplasias, síndromes metabólicas, doenças autoimunes e degenerativas (Tsuji, Rubin, & Marra, 2014). Neste aspecto, os atributos das CTA sugerem um promissor papel para as terapias celulares (Zuk *et al.*, 2002). A linhagem de CTA mais estudada e aplicada clinicamente são as do tipo hematopoiéticas encontradas na medula óssea.

A primeira observação de CTA nos seres humanos ocorreu em 1928 quando Alexander A. Maximow percebeu que células precursoras da medula óssea eram capazes de gerar fenótipos hematopoiéticos distintos (Bian *et al.*, 2016; Igor & Konstantinov, 2000; Li *et al.*, 2015). Além disto, estas células eram capazes de formar unidades formadoras de colônia fibroblastóides – UFC-F (*Colony-forming unit-fibroblasts - CFUF em inglês*) e proliferação em cultura (Russo, Yu, Belliveau, Hamilton, & Flynn, 2014). Em seguida, numerosas pesquisas visaram entender a biologia e aplicabilidade terapêutica destas células (Kaltschmidt; kaltschmidt; Widera, 2012; Pera; Reubinoff; Trounson, 2000; Young; Black, 2004). No entanto, com a expansão de pesquisas acerca de CTA foram percebidas as células estromais mesenquimais. Essas células também podem ser encontradas no tecido sanguíneo coexistindo com as CTA hematopoiéticas, como também podem ser encontradas em diversos tecidos, principalmente de origem do tecido embrionário mesoderma

(Bydlowski *et al.*, 2009; Dominici *et al.*, 2006; Maleki, Ghanbarvand, Behvarz, Ejtemaei, & Ghadirkhomi, 2014). A relativa facilidade de obtenção de inúmeros tecidos, a sua semelhança com as CTs do sangue, sua capacidade de imunomodulatória e imunossupressora facilitam a sua aplicação terapêutica tanto de forma autógena (o doador é o próprio receptor) quanto alógena (doador e receptor são distintos) (Jeremias *et al.*, 2014; Young; Black, 2004).

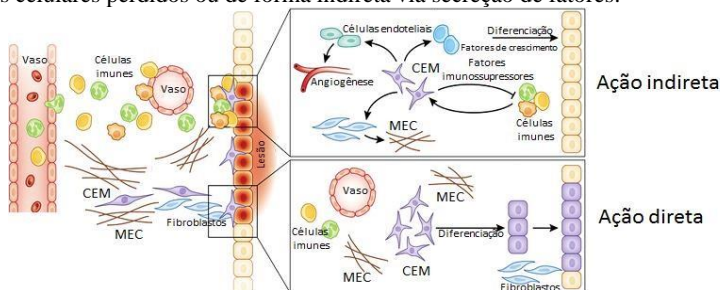
1.3. CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS (CEM)

As células estromais mesenquimais (CEM) correspondem a um tipo de CTA encontradas em diversos tecidos como a medula óssea, a derme, o rim, a córnea, o fígado, o músculo, a polpa dentária e o TA (Kaltschmidt *et al.*, 2012; Young & Black, 2004). As CEM são fáceis de cultivar e expandir *in vitro* e podem ser utilizadas em transplantes autólogos e alogênicos já que são pouco imunogênicas (Coura *et al.*, 2008; Jeremias *et al.*, 2014).

As CEM são importantes para a manutenção e o reestabelecimento da integridade dos tecidos por causa de sua ação direta e indireta no microambiente que as requisita (Jeremias *et al.*, 2014). Hipotetiza-se que as CEM estão presentes em todos os tecidos e órgãos no estado quiescente até serem recrutadas para agirem no reparo tecidual (Fukada; Ma; Uezumi, 2014; Terzi; Izmirli; Gogebakan, 2016; Young; Black, 2004).

Na sua atuação direta, as CEM geram células progenitoras que irão migrar para a região lesionada e originar as células tecido-específicas necessárias (Fukada; Ma; Uezumi, 2014; Young; Black, 2004). Enquanto a ação indireta das CEM apoia-se na secreção de biomoléculas que irão agir em células vizinhas, efeito parácrino (Jeremias *et al.*, 2014; T. Wang, Guo, Liu, Xv, & Zhang, 2015). O perfil de secreção das CEM é constituído por fatores de crescimento (como o VEGF que proporciona a angiogênese), fatores citoprotetores (antioxidantes, por exemplo), citocinas pró e anti-inflamatórias que modulam a resposta inflamatória e que todos em conjunto são necessários para o processo de reparo tecidual adequado (Figura 4) (Bhang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Young; Black, 2004).

Figura 4. Ação das células-tronco na homeostasia tecidual. Quando ocorre uma lesão o microambiente sinaliza para as CT que atuam de forma direta gerando novos tipos celulares perdidos ou de forma indireta via secreção de fatores.



Outra importante função das CEM é seu efeito endócrino. Estas células liberam fatores que vão agir em células distantes de outros tecidos contribuindo para relação dinâmica entre os tecidos e órgãos (Bhang *et al.*, 2014; B.-S. Park *et al.*, 2010; Pawitan, 2014). Dessa forma, as CEM participam no combate da degeneração corpórea ao auxiliarem na sua manutenção (Fukada *et al.*, 2014).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular definiu em 2005 as características fundamentais das CEM que incluem: capacidade de adesão ao plástico, morfologia fusiforme, expressão dos antígenos de superfície mesenquimais CD105⁺ (endoglina), CD73⁺ (ecto-5'-nucleotidase) e CD90⁺ (Thy-1) e ausência dos antígenos de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 \square ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR; capacidades de proliferação a longo tempo, capacidade de formar CFU-F e capacidade em se diferenciar em fenótipos mesenquimais (Ana Belén Carrillo-Gálvez, Angélica García-Pérez, Marién Cobo, 2013; Bernardo & Fibbe, 2013; Dominici *et al.*, 2006; Ortiz Gea, 2010) (Ortiz Gea, 1973). Entretanto, ainda não há um consenso sobre as características exclusivas destas células, sendo necessários mais estudos para esta finalidade (Bernardo & Fibbe, 2013).

1.4.APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS COM ESTROMAIS MESENQUIMAIS

As CEM apresentam uma alternativa promissora de terapias regenerativas (Jeremias *et al.*, 2014). Diversos resultados se mostraram promissores no tratamento de inúmeras patologias (Dominici *et al.*, 2006; Kaltschmidt *et al.*, 2012; T. Wang *et al.*, 2015), principalmente no tratamento de doenças cardiovasculares e nas síndromes metabólicas que incluem a diabetes (Sivakumar *et al.*, 2015). São ainda visadas para outros tratamentos como as doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes, doenças hepáticas, doenças de ossos e cartilagem, doenças genéticas como o autismo (Jung & Brack, 2014; Latil *et al.*, 2012; Mizuno, Tobita, & Uysal, 2012). Além disso, a biotecnologia estuda o potencial terapêutico das CEM para agirem de forma anticâncer (modificação celular das CEM ou o uso destas como veículos de fatores anticâncer) (Huang *et al.*, 2016; Sharpless & Depinho, 2004).

A cardiologia é a área médica que está se beneficiando mais rapidamente da terapia celular com CEM. A aplicação clínica destas células apresentou promissores resultados em vários trabalhos. Em 2003, um trabalho coordenado por Carvalho AC, demonstrou que injeções intramiocárdicas de CT da medula óssea melhoram o fluxo

sanguíneo do miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca (Perin *et al.*, 2003). Doenças cardíacas como a coronariopatia, infarto do miocárdio e doença de Chagas que proporcionam um quadro clínico de insuficiência cardíaca são responsáveis pela maior taxa de mortalidade no ocidente (Silva *et al.*, 2014). Os estudos pré-clínico e clínicos já mostram resultados promissores com melhora da função cardíaca após a terapia celular com CEM em pacientes. Além da cardiologia, o uso terapêutico das CEM trouxe benefícios para o tratamento da Diabetes tipo I (quando as células β do pâncreas param ou reduzem a produção de insulina em resposta a presença de glicose) (Sivakumar *et al.*, 2015). Resultados clínicos obtidos com CEM mostraram que estas células produziram novas células β reduzindo a hiperglicemia. A reumatologia também obteve resultados positivos com o uso de CEM como em pacientes com Osteoartrite (doença progressiva que causa a degeneração do sistema osteo-cartilaginoso comum em atletas e pacientes idosos). Paciente com lesões na cartilagem articular submetidos a infusão de CEM mostraram redução da sensibilidade a dor e melhora funcional (Tsuji *et al.*, 2014). O tratamento com CEM proporcionou melhorias para pacientes com Osteogênese Imperfeita (doença que fragiliza o sistema ósseo) tanto em pacientes infantis quanto adultos. Devido a sua capacidade de modular as respostas autoimunes, as CEM foram utilizadas em tratamento clínico de pacientes com doença de Crohn (doença autoimune que afeta o Sistema gastrointestinal) e na Esclerose Múltipla (doença inflamatória crônica desmielinizante do sistema nervoso central que leva a danos irreversíveis). A terapia celular com CEM também é promissora para doenças hepáticas

(Li *et al.*, 2015). Em um ensaio clínico, em fase inicial, mostrou melhoras na qualidade de vida de pacientes com Cirrose Hepática em fase final. Além destes resultados clínicos, há outros resultados pré-clínicos com grande potencial para tratar inúmeras enfermidades ainda sem cura (Ogura *et al.*, 2014; Sciences & Clinic, 2014; Silva *et al.*, 2014; Sivakumar *et al.*, 2015).

O sucesso da terapia celular com CT depende de alguns fatores: a forma de inoculação no organismo (intravenosa ou diretamente na área alvo), do estado do paciente, da qualidade, da eficiência destas células e da fonte de obtenção destas (Tsuji *et al.*, 2014). Assim, há a preocupação no meio científico para buscar as melhores fontes dessas células. Uma notável fonte de CEM é o TA subcutâneo (Zuk *et al.*, 2002). O TA pode conter até 3 vezes mais CEM do que outras fontes, com por exemplo a medula óssea que contém menos de 1% de CEM do

total das células mononucleadas (Tsuji *et al.*, 2014; Yokomizo *et al.*, 2011). Ademais, as CEM do TA podem ser obtidas de locais de fácil acesso como a partir da região abdominal, coxas, braços e da região facial (Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014). Por fim, vem sendo cada vez mais explorada a rica secreção de fatores citoprotetores pelas CEM do TA (Bhang *et al.*, 2014; B.-S. Park *et al.*, 2010). Os fatores secretados por estas células demonstram alto poder contra o estresse oxidativo, a senescência celular e fotoenvelhecimento (X. Xu *et al.*, 2014). Assim, o TA destaca-se como uma fonte alternativa promissora de CEM para uso terapêutico (Bian *et al.*, 2016; B.-S. Park *et al.*, 2010).

1.5. TECIDO ADIPOSEO (TA)

O tecido adiposo (TA), também conhecido como tecido gorduroso é um tipo de tecido conjuntivo de propriedades especiais. Esse tecido é altamente especializado na reserva e na produção energética (Badalà, Nouri-mahdavi, & Raoof, 2008; Dani & Billon, 2012). Também é reconhecido por prover a defesa mecânica e pela síntese de diversos hormônios que atuam quase todos, senão os sistemas do organismo, como o sistema digestório, imune, reprodutor, esquelético e nervoso (Coelho, Oliveira, & Fernandes, 2013; Dani & Billon, 2012; Ibrahim, 2010).

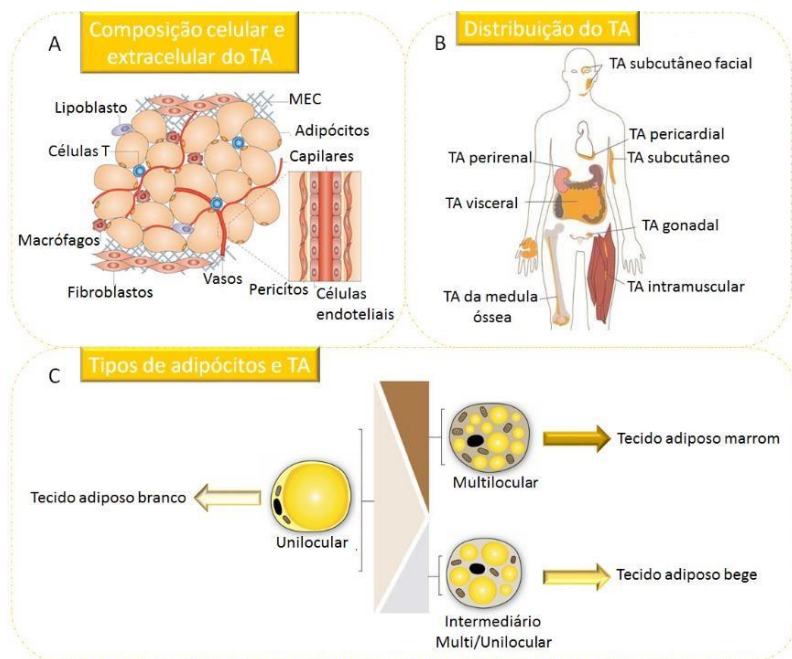
Estruturalmente, o TA é um tecido altamente vascularizado e tem como principal tipo celular os adipócitos (A. Park, Kim, & Bae, 2014). Os adipócitos são células com tamanho entre 20 e 200 μm , e ocupam o maior volume do TA (Badalà *et al.*, 2008). Estas células são especializadas no armazenamento de lipídios, constituídos principalmente por triglicerídeos, em inclusões (ou também denominado de lóculos) suspensos no citosol da célula (A. Park *et al.*, 2014). Os adipócitos podem ser do tipo unilocular (único lóculo que pode ocupar 95% da área celular) ou multilocular (vários pequenos lóculos e muitas mitocôndrias) de acordo com o tipo de TA (Bian *et al.*, 2016; A. Park *et al.*, 2014).

O TA é um tecido muito heterogêneo que difere na regionalização anatômica, na sua composição, microvasculatura, inervação, características metabólicas, composição de matriz extracelular e secreção de fatores (Figura 5) (Badalà *et al.*, 2008; Bian *et al.*, 2016). No entanto, generalizando, a composição celular inclui (além dos adipócitos) células residentes e transientes como as células imunes, fibroblastos, células neurais, células progenitoras de adipócitos (lipoblastos) e células-tronco adultas (Figura 5A) (Dani & Billon, 2012; Tsuji *et al.*, 2014). Essas células são separadas por uma esparsa matriz

extracelular rica em fibras reticulares constituídas principalmente por colágeno tipo III (Dani & Billon, 2012).

O TA é amplamente distribuído por todo o organismo, podendo ser encontrado ao redor de vísceras, na medula óssea, intramuscular e sob toda a pele, mais especificamente na região denominada de tela subcutânea (Bian *et al.*, 2016). A região de deposição do TA permite classificá-lo como subcutâneo (localizado na tela subcutânea subjacente a derme da pele), intraperitoneal ou perivisceral (regiões profundas da tela subcutânea abdominal), visceral (ao redor de vísceras), na medula óssea e ectópico (deposição em áreas cardíacas, vasos e músculos entre outros) (Figura 5B). Além disto, o TA pode ser classificado quanto ao tipo de adipócito que o constitui: TA branco, TA marrom e TA bege (Figura 5C) (SanchezGurmaches & Guertin, 2014).

Figura 5. Composição, distribuição e tipos de TA. Composição celular, tipos de TA e de adipócitos. (A) O TA é altamente vascularizado e constituído por diversos tipos celulares como lipoblastos, macrófagos, fibroblastos e majoritariamente por adipócitos. (B) O TA é amplamente distribuído por todo o organismo podendo ser subcutâneo, visceral e ectópico (medula óssea, gônadas, músculo e pericárdico, dentre outros). (C) A principal célula constituinte do TA é o adipócito e este pode ser unilocular, multilocular e intermediário entre os dois caracterizando o TA em branco, marrom e bege, respectivamente. Fonte: Adaptado de (Ouchi, 2011).



O TA branco, constituído por adipócitos uniloculares, é mais desenvolvido e distribuído no organismo (A. Park *et al.*, 2014). Sua principal função é de armazenamento de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato). Além do mais, esse tecido tem uma poderosa função endócrina, principalmente no sistema nervoso central e no sistema gastrointestinal (Dani & Billon, 2012). Até os 20 anos um indivíduo sadio tem uma distribuição homogênea desse tecido. Entretanto, com o avanço da idade, há uma redistribuição deste (Bian *et al.*, 2016). O TA subcutâneo superficial se reduz, principalmente na região facial e extremidades dos membros. Enquanto aumenta na região peri e visceral, cardíaca e na medula óssea que compromete a função

destes tecidos (Ibrahim, 2010). O acúmulo do TA visceral está associado ao aumento de índices de Síndromes Metabólicas, metástases e doenças cardiovasculares (Bian *et al.*, 2016; Ibrahim, 2010). Já o TA na região da medula óssea está associado a doenças reumáticas, como osteoporoses e artrites e também metástases ósseas.

Na espécie humana, o TA marrom é abundante em recém-nascidos para a transição útero-ambiente externo, porém, é reduzido para quase vestigial após 1 ano de nascimento (A. Park *et al.*, 2014). No adulto, esse tecido pode ser encontrado somente em algumas regiões como a cintura pélvica (em torno da adrenal, por exemplo) e a Inter escapular (em torno da laringe e tranqueira, por exemplo) e as veias (Bian *et al.*, 2016).

O TA marrom tem a função termogênese, importante para animais que estão no fim da hibernação. Esta função ocorre devido à presença da proteína desacopladora termogenina na membrana interna das mitocôndrias dos adipócitos multiloculares (A. Park *et al.*, 2014). A termogenina inibe a síntese de ATP e assim, desvia grande parte da produção energética para a forma de calor. Já a denominação “marrom” deste tecido ocorre devido a sua alta vascularização (sangue é rico em ferro) que capta a energia térmica e dando uma tonalidade marrom ou parda ao tecido (A. Park *et al.*, 2014).

O TA bege foi recentemente descoberto e ainda há poucos dados sobre ele. Anteriormente, este tecido era considerado como TA branco, porém, distinções entre eles foram observadas. Oficialmente o TA bege é um subtipo de TA branco que surgiu sob estímulo do frio (Dani & Billon, 2012; A. Park *et al.*, 2014). No TA bege são encontrados tanto adipócitos uniloculares como os multiloculares. Além disto, o aumento dos adipócitos multiloculares está associado com a angiogênese o que causa uma tonalidade mais escura que o TA branco, porém, mais clara que o TA marrom (Dani & Billon, 2012). Portanto, há uma mistura do TA branco e do TA marrom no TA bege. Além do mais, este último tecido apresenta funções intermediárias entre o TA branco e o TA marrom, como termogênese e reserva energética. O TA bege já foi encontrado na região subcutânea do pescoço humano, entretanto, acredita-se que ele possa ocorrer em outras áreas anatômicas como a face, por exemplo (A. Park *et al.*, 2014).

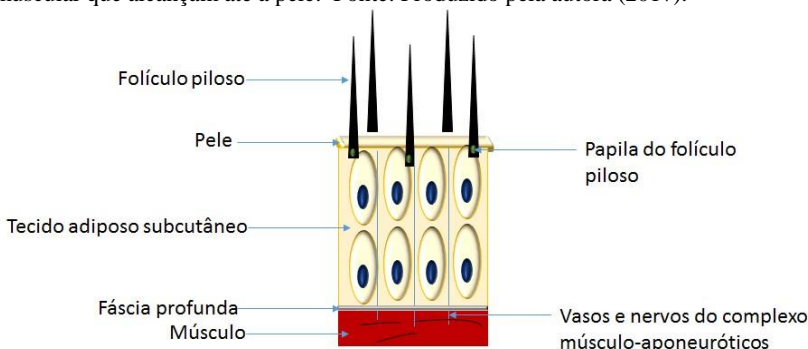
A enorme diversidade do TA o torna uma excelente fonte de estudos para diversas áreas de pesquisas, como as pesquisas regenerativas que utilizam células-tronco para estes fins (Bian *et al.*, 2016; Zuk *et al.*, 2002). Ciente disto, a comunidade científica intensificou suas investigações do TA como fonte alternativa de células-

tronco adultas mesenquimais. Atualmente, a região subcutânea é a mais visada para estas investigações devido a seu fácil acesso em comparação com as demais deposições do TA. O TA subcutâneo representa mais de 80% do TA corpóreo (Coelho *et al.*, 2013). O TA subcutâneo difere estruturalmente de acordo a região anatômica de deposição. Este tecido pode ser constituído por dois extratos (ou compartimentos) como ocorre na região do tronco e membros ou apenas um extrato como no caso da região subcutânea da face (Original, 2010). Além disto, o TA subcutâneo facial tem duas origens embrionárias (crista neural e mesoderme), enquanto o TA subcutâneo abdominal tem origem apenas no mesoderma (Berry, Stenesen, Zeve, & Graff, 2013). Estas diferenças alteram o nicho celular (células, matriz extracelular e biomoléculas solúveis ou inseridas na matriz) que influenciam a fisiologia e o metabolismo das células, como as células-tronco. Portanto, é fundamental verificar as características de células obtidas de diferentes regiões do TA (Sowa *et al.*, 2013).

1.6. TA SUBCUTANEO FACIAL (TA FACIAL)

O tecido adiposo da face (TA facial) é mais fino que em diversas outras localidades como na região abdominal (Silva, 2010). Este tecido é constituído por uma única camada, seccionado de forma vertical, contendo anexos epidérmicos, como as papilas do folículo piloso, além de toda a constituição celular e extracelular que ocorre no TA descrito anteriormente no item 1.3 (Figura 6) (Original, 2010; Silva, 2010).

Figura 6. Desenho esquemático da estrutura uniestratificada e disposição vertical do TA facial. Pele, TA e tecido muscular. O TA é um tecido intermediário entre a pele e a região muscular sendo constituído na face por uma única camada de adipócitos, contendo também algumas papilas do folículo piloso (anexo epidérmico) e atravessado por vasos e nervos do complexo músculo aponeuróticos do tecido muscular que alcançam até a pele. Fonte: Produzido pela autora (2017).



Áreas mais laterais do TA facial, como as têmporas e ao redor das orelhas, tem origem embriológica nas células da crista neural. Há também participação das células da mesoderme paraxial para formar o TA facial, diferente do resto do organismo que tem origem apenas da mesoderme (Berry *et al.*, 2013; Dani & Billon, 2012).

A mesoderme é o terceiro folheto embrionário originado na gastrulação dos animais triblásticos (Billon *et al.*, 2007). Ela é responsável pela geração de células mesenquimais, como células musculares, condrócitos, osteócitos, hepatócitos e adipócitos que irão constituir o tronco e os membros do organismo (Chau *et al.*, 2014; Young & Black, 2004b). Já a crista neural (com origem do ectoderma) é uma estrutura embrionária transitória que surge durante a neurulação dos vertebrados (Kaltschmidt *et al.*, 2012) e origina, dentre outros, componentes celulares craniofaciais, como as células do TA (Bressan *et al.*, 2014; Le Douarin, Calloni, & Dupin, 2014). Dentre os fenótipos celulares derivados da crista neural, destacam-se ainda os melanócitos que são células especializadas em lidar com danos gerados por raios solares, como a radiação ultravioleta (Jablonski & Chaplin, 2010). Além de melanócitos, a crista neural pode originar diversos tipos de neurônios periféricos sensoriais que se distribuem ao longo do corpo (Kaltschmidt *et al.*, 2012; Le Douarin *et al.*, 2014).

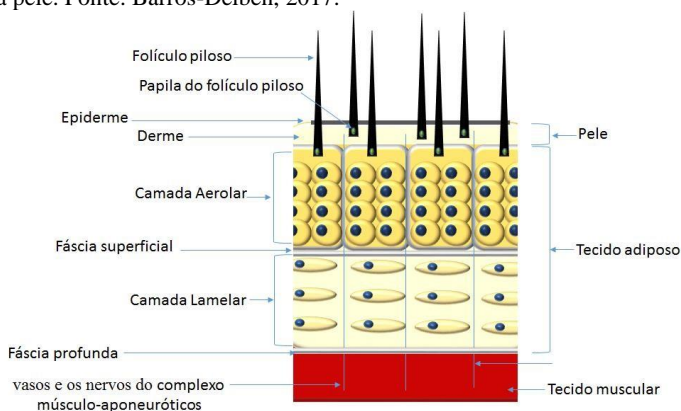
1.7. TECIDO ADIPOSO SUBCUTÂNEO ABDOMINAL (TA ABDOMINAL)

O tecido adiposo subcutâneo da região abdominal (TA abdominal) é caracterizado pela presença de dois extratos separados por tecido conjuntivo denso fibroso (fáscia superficial): a camada aerolar e a camada lamelar (Kumar, Kumar, Pandey, & Aithal, 2011). A camada aerolar é a mais superficial e mantém contato com a derme da pele. Esta camada é estruturada em forma de “pacotes” de adipócitos globulares, pequenos, turgidos e superpostas. Na região mais superficial da camada aerolar ainda podemos encontrar as papilas dos folículos pilosos da pele (Kumar *et al.*, 2011). Já a camada lamelar, mais profunda, é organizada com adipócitos fusiformes, também superpostas, mas em lâminas com maior capacidade de armazenar o tecido gorduroso excessivo. Um adipócito da região lamelar pode hipertrofiar a ponto de aumentar em até 10 vezes seu tamanho original (Kumar *et al.*, 2011). Portanto, é nesta última camada que comumente ocorre a expansão do TA subcutâneo e está associado à Lipodistrofia (redistribuição da gordura corporal). Entretanto, em regiões onde a espessura da pele é maior, como o tórax, a camada aerolar é mais desenvolvida do que a camada lamelar (Kumar *et al.*, 2011).

É através destas duas camadas do TA que os vasos e os nervos vindo dos espaços do complexo músculo-aponeurótico do abdômen (formado pelos músculos retos abdominais e pelos músculos anterolaterais) atingem a derme da pele (Figura 7). Ademais, o TA abdominal ocorre de forma contínua sob a derme no sentido horizontal, diferentemente do que ocorre no TA da face (Bian *et al.*, 2016).

Figura 7. Desenho esquemático da estrutura biestratificada do TA abdominal.

Esquematização da estrutura do TA subcutâneo abdominal e sua inserção entre os tecidos tegumentar e muscular. Pele subjacente ao TA subcutâneo constituída pela epiderme e pela derme com seu anexo epidérmico (folículo piloso). Subjacente a pele há a região subcutânea contendo o TA subdividido em camada areolar e a camada lamelar, separadas pela fásia superficial. Dentro da camada areolar existem bolsões de tecido conjuntivo delimitados por tecido conjuntivo fibroso e presença das papilas do folículo piloso na região mais superficial. Camada lamelar mostrando a disposição de adipócitos mais espaçados por matriz extracelular e separada da camada muscular pela fásia profunda. Vasos e Nervos do complexo músculo-aponeurótico oriundos da região muscular atravessando a região subcutânea até atingir a pele. Fonte: Barros-Delben, 2017.



O TA abdominal tem origem no folheto embrionário mesoderma que é responsável por gerar todos os tecidos conjuntivos do corpo com exceção da região craniofacial. Durante o desenvolvimento embrionário a mesoderma sofre diferenciação e neste processo surgem os mesodermas paraxial e lateral, responsáveis por formarem o TA abdominal. A mesoderma paraxial (que também participa na formação do TA facial) irá formar adipócitos multiloculares, comuns no TA marrom e no TA bege. De outra forma, a mesoderma lateral é a grande responsável por formar o TA branco que ocorre no TA abdominal (Billon *et al.*, 2007; Dani & Billon, 2012). Entretanto, é necessário esclarecer que a fonte dos adipócitos multiloculares do TA marrom advém dos adipócitos uniloculares os quais sofrem trans diferenciação para o fenótipo multilocular. A mesoderma é responsável por todo o TA subcutâneo do tronco e membros, participando de forma mais reduzida na região facial (Chau *et al.*, 2014; Dani & Billon, 2012).

1.8. CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS ISOLADAS DO TA HUMANO

Há mais de 40 anos sabe-se que o tecido adiposo (TA) é um rico reservatório de células percursoras, mas foi somente no início da década passada que seu potencial multipotente foi confirmado (Zuk *et al.*, 2002). Especula-se que aproximadamente 3% da fração vascular estromal (FVE - fração descartável de lipoaspiração) do TA seja constituída por CEMTA, portanto uma quantidade maior do que se obtém da medula óssea (menos de 1%) (Kern, Eichler, Stoeve, Klüter, & Bieback, 2006). Estas células são interessantes alternativa para terapias celulares por serem obtidas em grandes quantidades e por meio procedimentos minimamente invasivos (Russo *et al.*, 2014; Zuk *et al.*, 2002).

Em 2014, a Sociedade Internacional de Aplicação Tecnológica do TA (*International Fat Applied Technology Society - IFATS, em inglês*) denominou as CEM do TA como células-tronco estromais/mesenquimais derivadas do TA (*Adipose-derived Stromal/stem Cells –ASCs, em inglês*) para se referir às CEM do TA. Neste mesmo ano, a IFATS salientou alguns critérios mínimos para o isolamento imediato de ASCs, como: células plástico-aderentes expressão positiva de $CD34^{+}$ / $CD73^{+}$ / $CD90^{+}$ / $CD105^{+}$ e $CD45^{-}$ (Bourin *et al.*, 2013). Todavia, com a expansão celular, as células $CD34^{+}$ são reduzidas e a linhagem celular demonstra um padrão de expressão negativa para este marcador (Bourin *et al.*, 2013; Russo *et al.*, 2014). Assim, este perfil torna-se mais condizente com os critérios estabelecidos em 2005 pela Sociedade Internacional de Terapia celular para obtenção de CEM. No presente trabalho usaremos a sigla em português do termo célula estromal mesenquimal do TA (CEM-TA) (Dominici *et al.*, 2006).

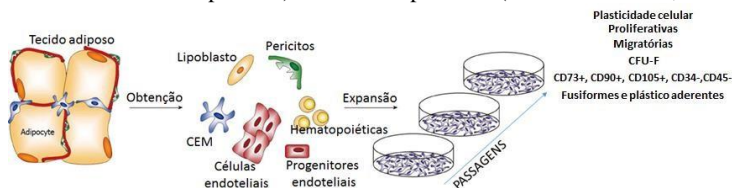
As CEM do TA demonstram alta capacidade de migrar e gerar diversos fenótipos celulares com inserção e interação no microambiente lesado (Ogura *et al.*, 2014). Além disto, as CEM-TA mostraram maior reprodutibilidade de isolamento e alta capacidade de proliferação celular quando comparadas com outras CEM isoladas da derme, por exemplo (Kern *et al.*, 2006). Entretanto, essas células tendem a entrar mais rápido em senescência celular (Zuk *et al.*, 2002). Diversos autores relatam que após algumas passagens (p), p20 por exemplo, as CEM-TA já demonstram sinais de pré senescência, alterando seu potencial de diferenciação, proliferação e migração celular (Sui, Hu, Zheng, & Jin, 2016; Vessoni *et al.*, 2012). Todavia, outros autores reportaram expansão celular a longo tempo sem causar instabilidade genética ou

senescência por replicação celular. Em contrapartida, a abundância da CEM-TA obtida na FVE possibilita transplantes destas imediatamente após a obtenção da FVE sem precisar passar por expansão celular. Muitos pesquisadores já aplicaram as CEM-TA obtidas desta forma em pacientes durante a própria cirurgia de extração do TA e reaplicaram em áreas alvos da terapia do paciente doador (Bian *et al.*, 2016). Portanto, a aplicabilidade terapêutica das CEM-TA também é vantajosa em termos financeiros, visto que não é essencial o uso de laboratório, materiais e reagentes para obter uma quantidade mínima para transplante como ocorre com as CEM obtidas das demais fontes (Bian *et al.*, 2016).

As CEM-TA também apresentam um poderoso perfil de secreção rico em biomoléculas que atuam na angiogênese (VEGF, HGF, PDGF, FGFb), na osteogênese (BMP2) e na supressão e modulação do sistema imune (Bhang *et al.*, 2014). Ademais, as CEM-TA secretam fatores antioxidantes, anti senescência e anti-fotoenvelhecimento (T. Wang *et al.*, 2015). Alguns autores sugerem que o verdadeiro potencial terapêutico das CEM esteja no seu efeito parácrino, sendo consideradas umas das mais eficientes CT adultas com esta ação e, portanto, excelente alternativa para aplicação terapêutica (Ogura *et al.*, 2014).

Além de CEM-TA, o FVE contém vários outros tipos celulares, como células imune, células precursoras de adipócitos (lipoblastos), pericitos, células endoteliais, células hematopoiéticas, entre outras (Figura 8). Assim, a FVE formada é muito heterogênea, constituída por várias linhagens celulares logo após a sua extração do tecido que vão sendo perdidas ao longo da expansão celular (Sowa *et al.*, 2013).

Figura 8. Isolamento e expansão das CEM-TA. A fração vascular estromal (FVE) apresenta uma população heterogênea de células contendo adipócitos, pericitos, células endoteliais, hematopoiéticas, progenitores endoteliais e de adipócitos (lipoblasto) e CEM. Após algumas passagens ocorre uma homogeneização desta população que apresenta um perfil fenotípico mesenquimal (plasticidade célula, proliferação, migração, capacidade de formar unidade formadora de CFU-F, marcadores de superfície celular de células estromais mesenquimais e morfologia fusiforme com aderência ao plástico). Fonte: Adaptado de (SCHERBERICH, 2013).



Recentemente, foi demonstrado que o TA pode conter uma pequena população de células multipotentes, denominadas de células “muse”. Essas células teriam características semelhantes as CT embrionárias, possuindo a potencialidade para originar fenótipos dos três folhetos embrionários: ectoderme, mesoderme e endoderme (Heneidi *et al.*, 2013; Ogura *et al.*, 2014). Além disso, foi relatado que as células do tipo muse são mais resistentes ao envelhecimento celular do que as demais células do organismo adulto, porém sem maior risco de gerar tumores, como rotineiramente ocorre quando as células adquirem a capacidade de escapar do envelhecimento (Heneidi *et al.*, 2013; Ogura *et al.*, 2014). O isolamento destas células ainda está em debate, visto que aparentemente são necessárias condições extremas de inóxia e ausência de soro bovino fetal para serem isoladas das demais células progenitoras, como as CEM (Heneidi *et al.*, 2013; Ogura *et al.*, 2014).

1.9. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE TA PARA ISOLAMENTO DE CEM

Segundo a Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (*International Society Of Aesthetic Plastic Sugery – ISAP, em inglês*) o Brasil é o segundo país no mundo que mais faz cirurgias estéticas, sendo que as mulheres correspondem a aproximadamente 85% dos pacientes. Entre as cirurgias mais procuradas estão a lipoaspiração, a abdominoplastia e a ritidoplastia facial (lifting facial, *em inglês*) (Bian *et al.*, 2016; Matarasso, Matarasso, & Matarasso, 2014; Sood, Jayaraman, & Sethi, 2011; Tasman, 2007), todos os três procedimentos são excelentes fontes de TA subcutâneo e assim importantes fontes de CEM do TA (Figura 9).

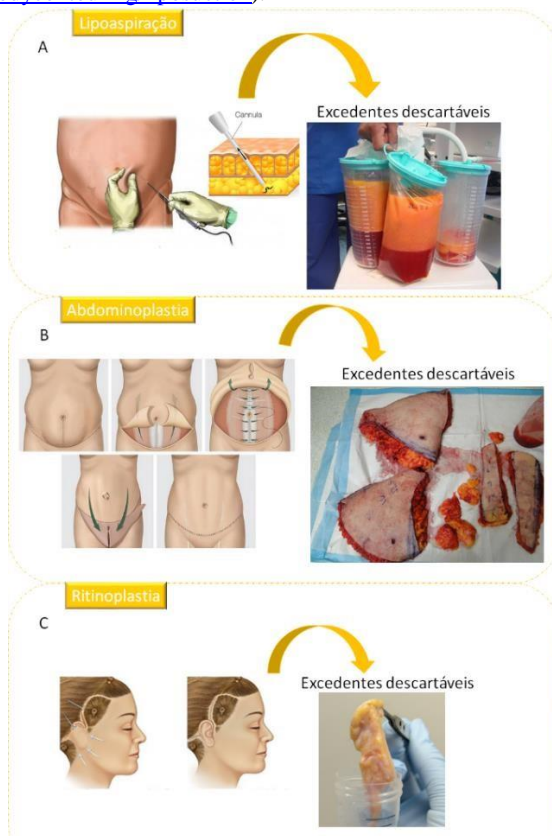
A lipoaspiração (também denominada de lipossucção) é um procedimento cirúrgico realizado, com anestesia local e sedação, por meio de cânulas submetidas a uma pressão negativa e introduzidas em pequenas incisões na pele (Figura 9A) (Sood *et al.*, 2011). A lipoaspiração pode ser realizada em áreas como o abdômen, coxas, flancos, braços e pescoço, dentre outras. Este procedimento apresenta fins estéticos, associado ou não a outros procedimentos (Bian *et al.*, 2016; Sood *et al.*, 2011). A lipoaspiração é realizada para a remoção do TA subcutâneo com deposição localizada, sendo que, após a cirurgia o lipoaspirado é descartado. Quando bem indicada (para adultos saudáveis e com gordura localizada) a lipoaspiração é uma técnica simples e rápida, com resultados excelentes.

O TA também pode ser extraído por meio de cirurgias bariátricas, como a abdominoplastia, uma das mais realizadas (Matarasso *et al.*, 2014). A abdominoplastia tem como principal alvo o auxílio de tratamento da obesidade ao extrair pele e TA subcutâneo excessivo (Figura 9B). Neste procedimento é necessária a anestesia geral para a extração de grande área de tecido tegumentar e adiposo (após a cirurgia o material dissecado é descartado) (Matarasso *et al.*, 2014).

A Ritidoplastia, também conhecido como Lifting Facial, é um procedimento cirúrgico amplamente utilizado para reduzir sinais do envelhecimento facial e assim de cunho estético (Chinski *et al.*, 2013; Tasman, 2007; Chinski *et al.*, 2013). Para a realização desse procedimento o paciente é submetido à anestesia local e sedação. Após, é realizada a dissecação do tecido tegumentar e adiposo (após a cirurgia o material dissecado é descartado) associado do SMAS (sistema músculoaponeurótico subcutâneo), método mais usualmente utilizado nos dias de hoje (Figura 9C) (Tasman, 2007).

Estes três procedimentos são excelentes fontes para a obtenção do TA e são muito realizados em todo o mundo. Apesar da Ritidoplastia descartar grandes quantidades de TA subcutâneo este material é pouco explorado para pesquisas com CEM-TA. A grande maioria de CEM-TA usadas em pesquisas são isoladas de TA obtidos por lipoaspiração da região abdominal e abdominoplastia, no qual reduz as chances de estudar CEM-TA da face (Bian *et al.*, 2016; Sowa *et al.*, 2013).

Figura 9. Processos de obtenção de CEM do TA. O TA abdominal é comumente obtido pelos procedimentos cirúrgicos lipoaspiração (A) e abdominoplastia (B). Enquanto o TA facial pode ser obtido por meio de ritidoplastia facial. Fonte: Adaptado de (http://www.ifcsutahblog.com/2011_01_01_archive.html) (<http://www.poustoplasticsurgery.com/case-of-the-week/category/bodycontouring/liposuction>).



1.10. SEGURANÇA NA MANUTENÇÃO DAS CEM *IN VITRO*: SENESCÊNCIA E INSTABILIDADE GENÉTICA

Segundo a resolução da diretoria colegiada (RDC) N°9 (14 de março de 2011) publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são sugeridos alguns requisitos mínimos para garantir a segurança e a qualidade de células humanas cultivadas e expandidas *in vitro*, bem como seus derivados quando são visados experimentos clínicos e terapêuticos (Afonso Cornélio & Batistuzzo de

Medeiros, 2014). Entre esses requisitos está o controle genético em células-tronco submetidas a cultura e expansão ou células modificadas geneticamente e/ou por tradução de proteínas. Esse controle busca investigar anomalias cromossômicas numéricas e/ou estruturais da instabilidade genética que aumentam a susceptibilidade a tumorigênese. Entretanto, não há uma orientação de qual e quantas alterações genéticas estão dentro da segurança terapêutica.

O cultivo das CT foi uma grande conquista que proporcionou milhares de pesquisas e resultados promissores para o uso destas em terapias celulares (Jeremias *et al.*, 2014; Zuk *et al.*, 2002). No cultivo celular podem-se realizar inúmeros experimentos *in vitro* visando estudar a biologia celular. Também se pode expandir a população celular para aplicações em testes pré-clínicos e clínicos (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014). Entretanto, o meio artificial utilizado para dar condições ao cultivo não é o ideal. Nessas condições as CT acumulam alterações genéticas como anomalias cromossômicas que as permitem se adaptar ao meio de cultivo (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; M Fenech *et al.*, 2011). O estímulo de proliferação celular predispõe as células a iniciar processos que podem comprometer o sucesso da terapia celular. Entre esses processos está a apoptose (morte celular programada) que ocorre quando há uma lesão no DNA irreparável e que compromete a viabilidade celular (Rodier & Campisi, 2011). Há também o processo de senescência celular (envelhecimento celular) que pode ocorrer tanto por excesso de danos não reparáveis e viáveis que induz a célula a sair do ciclo celular de forma irreversível (Terzi *et al.*, 2016) ou inicia o perigoso processo de neoplasia que gera uma proliferação descontrolada e perda de respostas ao meio (Sharpless & Depinho, 2004). Por fim, uma CT com instabilidade genética pode também adentrar no processo de diferenciação celular completa (Yamashita *et al.*, 2010), ou seja, gerar células filhas progenitoras comprometidas com um fenótipo celular mais apto ao microambiente. Dessa forma, não haverá autorrenovação e a população de CT pode-se esgotar (Jung & Brack, 2014).

As condições de cultivo celular artificial comprometem a eficácia e a segurança terapêutica das CT devido ao: uso de meio de cultura sintético (concentrações de aminoácidos inadequadas), soro bovino fetal, oscilações da atmosfera (temperatura, gases, umidade e luminosidade), oscilações no pH e ausência de tipos celulares típicos que participam da citoarquitetura do tecido, dentre outros fatores. Essas condições artificiais tendem a gerar principalmente estresse oxidativo,

grande fonte da instabilidade genética (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014).

O estresse oxidativo é caracterizado como um desequilíbrio das defesas celulares contra a oxidação, ou seja, ineficiência de moléculas antioxidantes e mecanismos de reparo celular e de DNA contra as espécies reativas culminando em danos por oxidação (Burton & Jauniaux, 2011; Heneidi *et al.*, 2013; Kirstein *et al.*, 2015). Uma das principais espécies reativas que causam danos oxidativos são as espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species - ROS, em inglês*) (Burton & Jauniaux, 2011). As ROS conseguem reagir com o DNA (predispõdo-o a quebras na dupla fita) e com estruturas celulares (organelas, proteínas e membranas) e acelulares como a matriz extracelular (Burton & Jauniaux, 2011; Olivieri *et al.*, 2015; Panich, Sittithumcharee, Rathviboon, & Jirawatnotai, 2016). Quando ocorre uma lesão no DNA, por exemplo, as células têm a oportunidade de repará-lo em ao menos três momentos durante o seu ciclo celular, os "checkpoints": durante a fase G1, fase S/G2 e a fase G2/M (Olivieri *et al.*, 2015). Nesses pontos moléculas reconhecedoras de erros, como a histona γ H2AX (isótipo da H2AX que sofre fosforilação após uma lesão no DNA), irão estimular cascatas de reconhecimento da lesão e de reparo destas (Olivieri *et al.*, 2015). Durante esse momento as células interrompem sua capacidade de proliferação celular até finalizar o processo de reparo (Sharpless & Depinho, 2004; Terzi *et al.*, 2016). Entretanto, o erro pode não ser corrigido e dependendo de sua consequência para a viabilidade a célula pode entrar em senescência celular, apoptose, neoplasia celular ou alterar sua capacidade de diferenciação celular (Rodier & Campisi, 2011; Terzi *et al.*, 2016). Portanto, a expansão celular em laboratório pode gerar inúmeros danos às células que as tornam ineficientes e perigosas para aplicação terapêutica. Dessa forma, é de suma importância avaliar a integridade das células quando se visa terapia celular (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014).

Apesar da instabilidade genética ocorrer em muitas CT mantidas em cultivo durante várias passagens, alguns trabalhos reportam ausência de instabilidade genética estatisticamente significativa na cultura celular (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; Bian *et al.*, 2016). Isso sugere que o tecido fonte das células e a manipulação da cultura são essenciais para obtenção de CT promissoras terapeuticamente (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

A terapia celular com células estromais mesenquimais é a área que mais cresce em pesquisas para a medicina regenerativa. Entretanto, o sucesso da terapia celular com essas células é dependente da sua fonte de obtenção, da sua qualidade e da sua eficiência. Uma fonte de CEM em evidência em pesquisas que visam a terapia é o TA obtido da região subcutânea. As CEM-TA são excelentes alternativas para a terapia celular devido suas vantajosas características em relação as demais células-tronco adultas: são abundantes no tecido, de fácil obtenção e apresentam uma rica secreção de fatores imunossuppressores, imunomodulatórios e citoprotetores. Essas características facilitam o uso biotecnológico para o tratamento de inúmeras patologias e distúrbios difíceis de serem tratadas pelo método tradicional.

As características das CEM-TA sugere que o TA seja uma notável fonte de CEM. Entretanto, a grande maioria dos estudos com CEM desse tecido são obtidas da região abdominal pelos procedimentos de lipoaspiração e abdominoplastia. Apesar da ritidoplastia ser amplamente realizada no mundo e uma grande quantidade de excedentes desta cirurgia, como o TA, ser descartado, são poucas as investigações das CEM destes excedentes.

O TA da região facial e do abdominal apresenta distinções como a origem embrionária e a estrutura e disposição onde ocorrem os depósitos de tecido adiposo. Outro fator relevante é que o TA abdominal está sob maior efeito de hormônios e outras biomoléculas normalmente associadas a alto índice de processo inflamatório. Em contrapartida, o TA facial é mais exposto a agente nocivos do meio ambiente como a temperatura, à radiação ultravioleta, poluição e produtos sintéticos. Ademais, os pacientes submetidos a ritidoplastia costumam ser mais velhos, com média de idade entre 50-65 anos, enquanto os pacientes submetidos a lipoaspiração e abdominoplastia são em sua maioria mais jovens, como média de idade entre 30-40 anos. Em conjunto, esses fatores podem alterar o efeito terapêutico das CEM. Nessa perspectiva, o presente trabalho buscou verificar se há diferenças nas propriedades das CEM do TA obtidas de duas regiões, face e abdômen humano, que possuem diferentes origens embrionárias e exposição ao meio. Para isso fez se necessário analisar comparativamente características típicas de CEM e também analisar outros aspectos como a integridade celular durante o cultivo destas células. Os resultados deste trabalho além de acrescentarem dados acerca de uma fonte de CEM pouco explorada, também podem sugerir aplicações distintas destas células para aumentar a sua eficiência terapêutica.

3. HIPÓTESE

As distinções entre o TA facial e do abdominal interferem no perfil e nas propriedades terapêuticas das células estromais mesenquimais isoladas destes.

4. OBJETIVO

Avaliar comparativamente a característica mesenquimal, a integridade genética e a funcionalidade das células estromais mesenquimais (CEM) isoladas do TA (CEM-TA) facial e abdominal humano.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1.1. Caracterizar comparativamente a morfologia e o padrão fenotípico mesenquimal das células isoladas do TA facial e do TA abdominal.

4.1.2. Avaliar comparativamente o potencial de diferenciação das células obtidas do TA facial e do TA abdominal para os fenótipos mesenquimais adipocítico, osteocítico e condrocítico.

4.1.3. Avaliar comparativamente a capacidade de migração celular das células isoladas do TA facial e do TA abdominal.

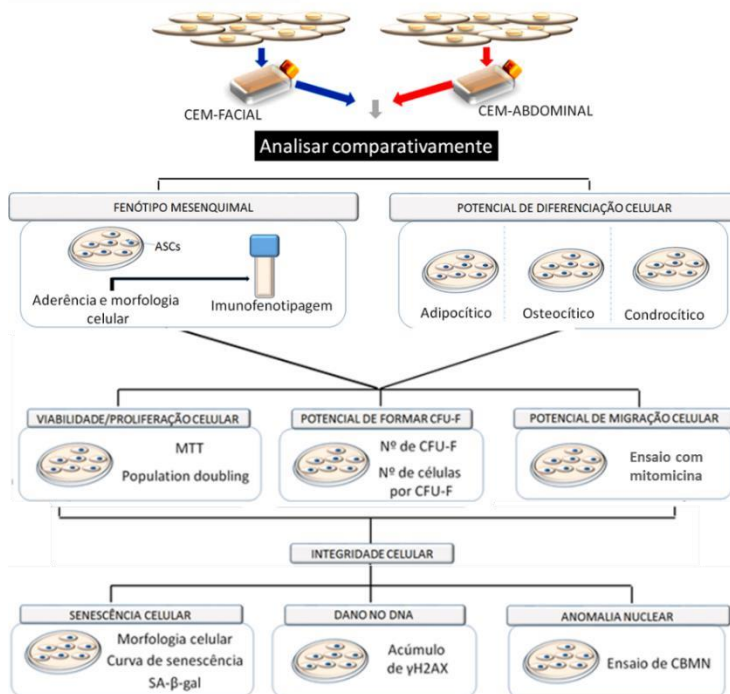
4.1.4. Avaliar comparativamente a capacidade e o potencial de formação de CFU-F das células obtidas do TA facial e do TA abdominal.

4.1.5. Avaliar comparativamente o perfil de senescência celular das células isoladas do TA facial e do TA abdominal

4.1.6. Avaliar comparativamente a integridade genética das células isoladas do TA facial e do TA abdominal.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. DELENHIAMENTO EXPERIMENTAL



Fonte: Produzida pela autora (2016).

5.2. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE TA HUMANAS

O TA abdominal e do facial foram obtidos de lipoaspirados abdominais e da região facial (região das têmporas) de pacientes submetidos a cirurgias plásticas ritidoplastia (*lifting* facial), respectivamente, por meio de colaboração com o Ilha Hospital e Maternidade e com o Hospital Universitário da universidade federal de Santa Catarina. As amostras biológicas só foram utilizadas no presente trabalho após os pacientes assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1).

O presente protocolo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tendo recebido certificado de aprovação (CAE: 41749315.7.0000.0121) do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina.

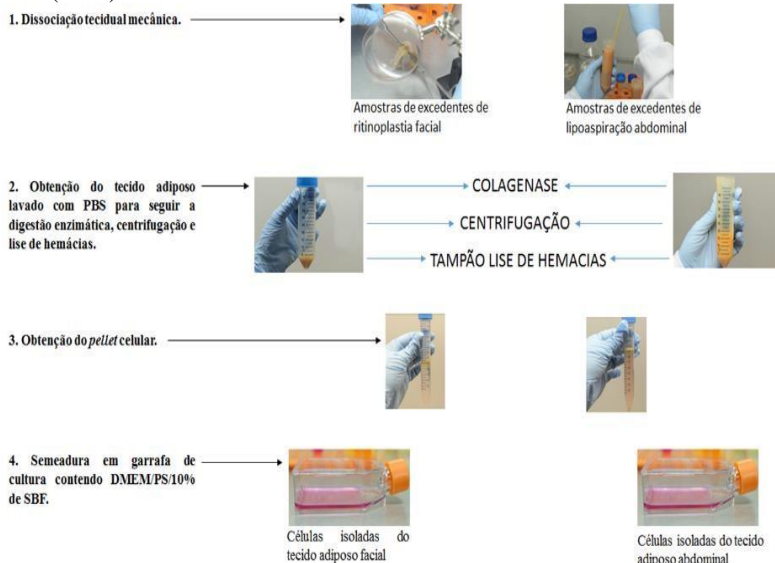
5.3. CULTURA PRIMÁRIA E ISOLAMENTO DE CEM DERIVADAS DO TA

No processo de isolamento das CEM-TA abdominais, o lipoaspirado da região abdominal foi lavado com PBS (*phosphate buffered saline*) (Gibco, EUA) e incubado com collagenase I [0,010 g/ml] (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da America - EUA) durante 40 minutos, a 37°C. Após este período, a enzima foi neutralizada com o meio de cultivo comercial DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (SigmaAldrich, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF – Vitrocel, USA), seguido de centrifugação a 251 g. O *pellet* foi suspenso com a solução de lise de hemácias (ANEXO 2), mantidas em incubação durante 10 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 251 g (Figura 10). Em seguida, as células foram suspensas e mantidas em DMEM suplementado com 10% de SBF contendo estreptomicina ([10µg/ml]; Sigma-Aldrich, USA) e penicilina ([200U/ml]; Sigma-Aldrich, USA), e semeadas em garrafas de cultura de 25 cm² (Corning, EUA), a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Durante os três primeiros dias o meio foi trocado diariamente, selecionando assim apenas as células aderentes ao plástico.

Para o isolamento das CEM-TA faciais, a tela subcutânea (ou também conhecida como região subcutânea) foi dissociada mecanicamente da derme e incubada com collagenase I durante 40 minutos, a 37° C dentro do fluxo laminar (Veeco, EUA). O restante do procedimento de isolamento seguiu os mesmos passos descritos acima para o isolamento das CEM-TA abdominais (Figura 10).

Ao atingir confluência de aproximadamente 80%, as células aderentes ao plástico, foram retiradas das garrafas de cultura com a utilização de tripsina/EDTA 0,25% (BD Biosciences, EUA) durante 3 minutos a 37°C, após este período a ação enzimática foi inibida com DMEM suplementado com 10% de SBF e a suspensão celular foi centrifugada com 251 g durante 7 minutos. As células foram então semeadas em novas garrafas de cultura de 25 cm² (Cornig, EUA) e mantidas em DMEM suplementado com 10% de SBF dentro de estufa úmida (Thermo Fisher Scientific, EUA) com uma atmosfera a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Esse processo foi repetido diversas vezes, sendo que cada uma delas foi contabilizada como uma passagem celular. As células do presente trabalho foram utilizadas entre as passagens 5 e 10, pois nesse intervalo as culturas são mais homogêneas.

Figura 10. Procedimento de obtenção das CEM do TA e do tecido abdominal humano. TA obtido por excedentes de ritidoplastia facial (esquerda), n=3 mulheres entre 30-35 anos, e por excedentes de lipoaspirados abdominal (esquerda), n=3 mulheres entre 50-65 anos. O TA facial e abdominal é dissociado da pele ou da fração oleosa. Por meio de centrifugação é obtido o *pellet* celular contendo células isoladas do TA. Fonte: Fotografias obtidas pela autora (2016).



5.4 ANÁLISES DO FENÓTIPO MESENQUIMAL

A avaliação do fenótipo mesenquimal ocorreu por análise de dados obtidos pelas observações e técnica descritas a seguir.

5.4.1. Análise morfológica e de adesão ao plástico por microscopia de contraste de fase

Para analisar a morfologia celular as células foram periodicamente visualizadas por meio de um microscópio invertido de contraste de fase (Olympus, IX71) e as imagens capturadas com a câmera acoplada ao microscópio (Olympus DP71).

5.4.2. Ensaio de citometria de fluxo para análise da expressão de antígenos de superfície celular

Foram realizados ensaios pela metodologia de citometria de fluxo para verificar a presença dos antígenos de superfície de membrana celular

CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105. Para esta análise, foram utilizados os anticorpos conjugados à fluorocromos (BD, USA) descritos na tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos utilizados na análise fenotípica pelo ensaio de citometria de fluxo.

ANTICORPOS	IMUNOGLOBULINA	FLUOROCROMO	DILUIÇÃO
ANTI-CD105 (BD)	IgG1 de camundongo	Ficoeritrina-cianina (PE-Cy5)	10 µl/50ml
ANTI-CD90 (BD)	IgG1 de camundongo	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	1 µl/50ml
ANTI-CD73 (BD)	IgG1 de camundongo	Ficoeritrina (PE)	5 µl/50ml
ANTI-CD45 (BD)	IgG1 de camundongo	FITC	5 µl/50ml
ANTI-CD34 (BD)	IgG1 de camundongo	PE-Cy5	5 µl/50ml
ISOTIPO (BD) 1	IgG1 de camundongo	PE-Cy5	5 µl/50ml
ISOTIPO (BD) 2	IgG1 de camundongo	FITC	1 µl/50ml
ISOTIPO (BD) 3	IgG1 de camundongo	PE	5 µl/50ml

Para os marcadores CD34 e CD45 foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico como controle positivo, uma vez que as CEM são negativas para estes marcadores.

Para a realização do ensaio, as células mantidas em condições normais de cultivo foram lavadas 3 vezes com PBS, dissociadas pela ação enzimática da tripsina/EDTA 0,05% durante 2 minutos e centrifugadas a 251 g durante 5 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi suspenso em PBS suplementado com 10% de SBF. Em seguida, 10^5 células foram adicionadas a tubos de citometria de fluxo e incubadas com 50 µL de PBS 1x suplementado com 10% de SBF contendo os anticorpos conjugados com fluorocromos: IgG1 mouse: antiCD34(PE), anti-CD45 (FITC), anti-CD73 (PE), anti-CD90 (FITC) and anti-CD105 (PercP), durante 1h a

4°C protegidos da luz. Após o período de incubação das amostras, as células foram lavadas com PBS suplementado com 10% de SBF, centrifugadas novamente a 251 g durante 5 minutos e suspensas em 200µL de PBS suplementado com 10% de SBF. Essas células foram analisadas no citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD) no LAMEB I (UFSC). Os dados foram gerados pelo software FACSDiva 6.0 e analisados pelo programa Flowing.

5.5. DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPOS MESENQUIMAIS

Para avaliar a potencialidade mesenquimal foram utilizados meios indutivos específicos para diferenciação em adipócitos e osteócitos (Coura *et al.*, 2008), condrocítico por meio de kit comercial de diferenciação celular e as diferenciações celulares foram confirmadas por meio de técnicas de coloração celular.

5.5.1. Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, 10^4 células foram semeadas e cultivadas como descrito no item 5.3 até confluência de cerca de 90%. Após, as células foram tratadas com meio indutivo específico contendo DMEM suplementado com 10% de SBF, indometacina [20mg/mL; Sigma-Aldrich], dexametasona [$2,5 \cdot 10^{-5}$ M; Sigma-Aldrich], insulina [10mg/mL; Sigma-Aldrich] e isobutilmetilxantina [0.5 mM]. O tratamento foi realizado por 22 dias. As culturas foram mantidas em estufa úmida com uma atmosfera de 37°C de temperatura, 5% CO² e 95% de umidade com trocas de meio a cada 3 -4 dias.

5.5.2. Diferenciação osteogênica

Para a diferenciação osteogênica, 10^4 células foram cultivadas em placas de 24 poços em DMEM suplementado com 10% de SBF em confluência cerca de 100%. Em seguida as células foram tratadas com meio indutivo específico contendo DMEM suplementado com 10% de SBF, β-glicerol fosfato [3.15 mg/ml Sigma-Aldrich], ácido ascórbico [50 µg/mL; Sigma-Aldrich], dexametasona [$2,5 \cdot 10^{-5}$ M; Sigma-Aldrich]. O tratamento foi realizado por 28 dias, sendo as culturas mantidas em estufa úmida com uma atmosfera de 37°C de temperatura, 5% CO² e 95% de umidade, com trocas de meio a cada 3-4 dias.

5.5.3. Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica foi utilizado o Kit StemXVivo Human/Mouse (R&D Systems) de acordo com o protocolo indicado

pelo fabricante. Para a realização do ensaio de diferenciação celular foram utilizadas, $2,5 \times 10^5$ células centrifugadas a 300 g durante 10 minutos para obtenção de um *pellet*. O *pellet* foi mantido em tubos cônicos tipo Falcon de 15 mL (Cornig, México) em estufa úmida com atmosfera a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Após, os *pellets* resultantes da diferenciação condrogênica foram fixados por 48 horas em paraformaldeído a 4%, desidratados e depois imersos em parafina. Os blocos foram cortados em seções de 5 µm, com auxílio de um micrótomo.

5.5.4. Colorações

5.5.4.1. Coloração com Oil Red e Vermelho de Alizarina

Para a realização das colorações, as células foram mantidas com os meios indutivos de diferenciação adipogênica e osteogênica, lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após, o paraformaldeído era descartado em recipientes apropriados e as células lavadas com água Milli-Q. Em seguida as células do meio adipogênico e do meio osteogênico eram incubadas com as soluções corantes Oil Red (Sigma-Aldrich, USA) (Anexo 3) e Vermelho de Alizarina (Riedel-de Haën, Germany) (Anexo 3), respectivamente, durante 5 minutos. Após, as células foram lavadas com PBS e analisadas em microscópio de contraste de fase Olympus IX71.

5.5.4.2. Coloração de Mallory

A avaliação do depósito de matriz extracelular na forma de fibras de colágeno da diferenciação condrogênica foi realizada através da coloração de Mallory. Para isso, os *pellets* submetidos ao meio condrogênico foram fixados em paraformaldeído 4% por 30 minutos, desidratados em uma série crescente de álcool (70%, 90% e 100 %) durante 10 minutos em cada e diafanizados em xilol em dois banhos de 10 minutos cada. Após, as amostras foram imersas em parafina líquida à 54°C, formando blocos. Todos os blocos parafinados foram seccionados (5 µm) em micrótomo (Leica), e os cortes obtidos posicionados sobre lâminas de vidro silanizadas. Após estes procedimentos, os cortes foram desparafinizados e reidratados, sendo as amostras coradas com o corante de Mallory (Anexo 3) durante 40 minutos. Os cortes foram desidratados em dois banhos de álcool 100% (5 minutos cada) e imersos em xilol por 5 minutos. Depois, as lamínulas foram colocadas sobre as amostras com Entelam. As amostras foram visualizadas em microscópio Olympus IX71 e as imagens capturadas com a câmera Olympus DP71'.

5.5.5. Curva de diferenciação celular para os fenótipos adipocíticos e osteocíticos

Para verificar o perfil de diferenciação celular, foi realizado o ensaio de diferenciação celular como descrito no item 5.5.4, entretanto com fixação e coloração celular a cada 3 dias. As células diferenciadas para o fenótipo adipocítico foram coradas com Oil Red O (SigmaAldrich, USA), fotografadas e em seguida contabilizadas quando se tratar do perfil adipocítico e a coloração avermelhada do Alizarin Red S

(Riedel-de Haën, Germany) foi quantificada pelo programa Image J quando se tratar do perfil osteocítico. Desta forma, é pretendido realizar um gráfico que irá demonstrar de forma comparativa o processo temporal da diferenciação celular de ambas as células.

5.6. ENSAIO DE VIABILIDADE/PROLIFERAÇÃO E FORMAÇÃO DE CFU-F

5.6.1. Ensaio de viabilidade/proliferação celular pelo teste de MTT

Para avaliar a viabilidade/proliferação celular, foi realizado o ensaio de MTT (Sigma-Aldrich, EUA) [(3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl) -5-(3carboximetoxifenil) -2- (4sulfofenil) -2H-tetrazolium)]. O ensaio de MTT é um método colorimétrico baseado na biorredução deste composto em um produto cromogênico de cor púrpura, solúvel em meio de cultura (formazan). A produção de cristais de formazan é proporcional a biorredução do MTT realizada por enzimas mitocondriais, portanto, quanto maior a atividade mitocondrial, maior a produção dos cristais e maior foi a coloração que pode ser medida por absorbância. Dessa forma, a leitura da absorbância desta solução, mensurada por espectrofotometria, foi proporcional à atividade mitocondrial e, por conseguinte, à viabilidade celular.

Para a realização do teste de MTT, foram semeadas cerca de 5×10^3 CEM do TA em cada poço de uma placa de 24 poços. A absorbância foi medida em triplicata e com $n=3$, em 4 pontos diferentes: 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas após a semeadura. Em cada um desses dias as células foram incubadas por 3 horas com MTT dissolvido em DMEM suplementado com 10% de SBF em estufa a 37°, 5% CO₂. Após esse período, o meio foi descartado e os poços foram homogeneizados com 100 µl de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida 80µl do homogeneizado foi transferido para novos poços de uma placa de 96 poços, nos quais foi realizada a leitura de absorbância

(560 nm) em multileitora de placas (Tecan Infinite M200) no Laboratório de célulastronco e regeneração tecidual - LAMEB I (UFSC). Foi utilizado como controle (branco), do experimento poços sem células tratados sobre as mesmas condições dos demais com células.

5.6.2. *Ensaio de proliferação celular* (Cumulative doubling population)

Para analisar o perfil de proliferação celular foi realizado um ensaio de curva de crescimento celular. Para isso foram semeadas 10^4 células / poço, $n=3$, em placas de 24 poços. Por 4 dias consecutivos, as células de cada triplicata foram dissociadas com tripsina/EDTA 0,05%, centrifugadas a 250 g por 5 minutos e o *pellet* celular suspenso com 1 ml de DMEM. Deste 1 ml, 10 μ l foram adicionados a outros 10 μ l do corante vital azul de Tripán para marcar as células inviáveis. Por fim, 10 microlitros dos 20 μ l total foram colocados na câmara de Neubauer (Hirschmann Techcolor) para contagem de somente as células não coradas em azul, viáveis, nos quatro campos.

5.6.3. **Ensaio de formação de unidade formadora de colônia de fibroblasto (CFU –F)**

Para avaliar a capacidade de replicação celular foram semeadas 500 células em placas de 35 mm contendo DMEM suplementado com 10% de FBS durante 5 dias. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (VETEC, Brasil) contendo 0,5% do corante Giemsa durante 10 minutos. Depois de decorrido o tempo de fixação, a solução foi descartada e as placas foram secas em temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas microfotografias para contabilizar, por meio do programa ImageJ, a quantidade de colônias e número de células por colônia.

5.7. MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar a capacidade de migração celular, foram preparadas monocamadas de células com confluência de 80-90%. A cultura celular foi incubada com mitomicina [10 μ l/ml] (Sigma-Aldrich, EUA) durante 3 horas e em seguida a monocamada celular foi submetida a uma lesão com uma ponta de pipeta 100 μ l. As culturas foram fotografadas nos instantes 0 e 24 horas após a lesão. Foram realizadas 5 medidas equidistantes na lesão em quatro campos distintos, quantificadas pelo programa ImageJ e os dados obtidos foram analisados pelo programa

GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

5.8 ANÁLISES DA SENESCENCIA E INTEGRIDADE GENÉTICA

5.8.1. Curva de Senescência celular

A curva de senescência proporciona analisar a capacidade de proliferação celular a longo tempo pelo aumento das passagens celulares. Para isso as células foram semeadas na concentração de 5×10^5 células/poço em placas de 6 poços e mantidas nas condições descrita no item 5.3 até atingir confluência. Ao alcançar 80% de confluência, as células foram dissociadas com tripsina/EDTA 0,05% e contadas em câmara de Neubauer. A soma foi plotada em gráfico de crescimento celular e 5×10^5 foram semeadas em novos poços de placa de 6 poços, para constituir nova passagem. Esse procedimento foi realizado até a diminuição quase completa da proliferação celular. Dessa forma, foi possível gerar um gráfico pelo programa GraphPad5 demonstrando a capacidade proliferativa das células no decorrer do aumento das passagens da cultura.

5.8.2. O ensaio de SA-b-gal (*Senescence Associated beta-gal*)

Apesar de não ser uma característica exclusiva, quando associada a outras características, o acúmulo da enzima β -galactosidase ácida está associado ao fenótipo senescente (Sharpless & Depinho, 2004). Para análise da atividade da β -galactosidase ácida nas culturas de CEM isoladas do TA, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% durante 40 minutos. Em seguida, foram realizadas novas lavagens com PBS e incubação com kit *Senescence Cells Histochemical Staining* (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) a 37 °C em atmosfera úmida a 5% de CO₂ durante 6 horas. Por fim, as células foram analisadas a microscopia de campo claro e fotografadas.

5.8.3. Ensaio de Imunocitoquímica para γ H2AX

Para verificar se as CEM-TA apresentaram quebras na dupla fita de DNA, foram realizados ensaios de imunofluorescência para a presença de γ H2AX, marcador característico de quebra na dupla fita (Lopez *et al.*, 2012). As células obtidas a partir do TA facial e do abdominal foram cultivadas em DMEM e mantidas em placas de 24 poços. Após a incubação, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído durante 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas com PBS e tratadas com PBS-Triton X-100 [0,25%] durante 40 minutos

para permeabilizar a membrana celular. Para impedir ligações com sítios inespecíficos, foi realizado um tratamento com PBS e 5% de SBF durante 1 hora. Após, foram incubados durante 1 hora a temperatura ambiente o anticorpo primário γ H2AX (Sigma-Aldrich, EUA), seguido do anticorpo secundário por mais 50 minutos. Os núcleos foram marcados com DAPI (4' -6-diamidina-2-fenilindol), seguido de análise ao microscópio de epifluorescência (Olympus, IX71).

5.8.4. Ensaio do bloqueio da citocinese pela citocalasina B

Para verificar se a cultura celular apresenta instabilidade nuclear que pode ser indicativo de senescência celular foi realizado o ensaio de bloqueio da citocinese pela citocalasina B (M Fenech *et al.*, 2011). Para isso, as culturas de CEM-TA foram incubadas com citocalasina-B [5 mg/ml] (Sigma-Aldrich, EUA) durante 48 horas. Após, as células foram dissociadas com tripsina/EDTA 0,05%, centrifugadas por 6 minutos a 251 g. Foram mantidos 500 μ l do sobrenadante sobre o *pellet* celular e este suspenso neste volume e foram realizados tratamentos com a solução hipotônica (água destilada e 1% de DMEM/10%SBF) e KCL [0,075%] durante 4 minutos. Para inibir a ação hipotônica foi acrescido a solução fixadora (9 metanol: 1 ácido acético) seguido de centrifugação por 6 minutos a 251 g. Após a centrifugação, as células foram incubadas durante 24 horas com a solução fixadora. Por fim, as células foram aplicadas em laminais histológicas limpas, coradas com o corante Giemsa 0,5% e analisada a microscópio de campo claro.

5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando software GraphPad versão 5 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Primeiramente foi verificado se os dados obtidos demonstravam uma distribuição gaussiana. Para isto, foi realizado o teste de Shapiro

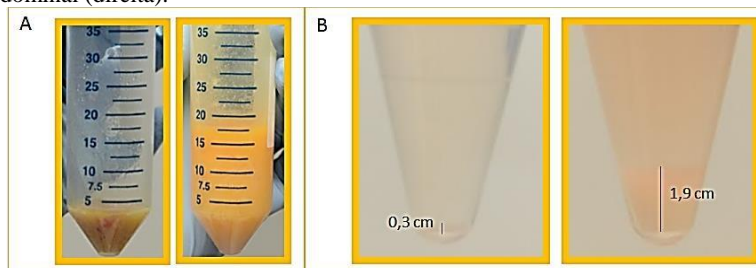
Wilk. Em seguida, os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste Bonferroni. Quando indicado, foi utilizado ainda o teste de T student, não pareado. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Cada experimento teve um $n=3$ (3 experimentos independentes).

6. RESULTADOS

6.1. RENDIMENTO DE PELLET CELULAR POR AMOSTRAS DE TECIDOS DE TA DA FACE E DO ABDOMEN

Nesse trabalho, em média, a cada 50 mL de TA abdominal lipoaspirado obtivemos cerca de 17 mL de TA ideal para isolamento das CEM (Figura 11 A). Além disso, esses 17 mL proporcionaram *pellets* celulares com cerca de 1,7 a 1,9 cm de altura (Figura 11 B). Assim, aproximadamente 4 mL de TA abdominal lipoaspirado proporcionou um *pellet* celular com cerca de 0,4 cm de altura. Este rendimento foi similar ao alcançado pelo TA facial obtido por meio de ritinoplastia facial. Em nosso trabalho, após realizada a dissociação do TA da pele facial obtivemos cerca de 4 mL (Figura 11 A). Essa quantidade resultou em um *pellet* celular de cerca de 0,3 cm de altura (Figura 11 B). Portanto, o rendimento de TA abdominal foi cerca de 6 vezes maior que o TA facial. No entanto, quando utilizamos mesmo volume inicial de TA de ambas as fontes o rendimento final de *pellet* celular foi 0,3 vez maior do TA abdominal em relação ao TA facial.

Figura 11. Rendimento de pellet celular de TA da face e do abdômen. Rendimento de TA da face (esquerda) e do abdômen (direita) após lavagem com PBS (A). Tamanho do *pellet* celular obtido do TA facial (esquerda) e do TA abdominal (direita).



6.2. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MESENQUIMAIS EM CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS ISOLADAS DO TA FACIAL E DO ABDOMINAL

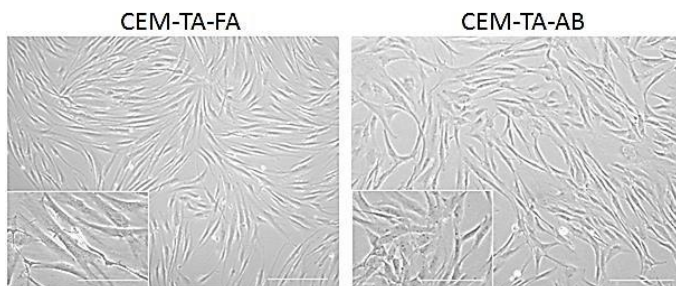
Seguindo os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, 2005, para obtenção de células-tronco mesenquimais, buscamos verificar se as células obtidas de ambas as fontes do TA, face e abdômen, compartilhavam o fenótipo mesenquimal e a capacidade para gerar fenótipos mesenquimais: adipócíticos, osteocíticos e condrocíticos.

6.2.1. Morfologia e adesão celular

Os resultados mostram que as células isoladas de ambas as fontes de TA apresentaram adesão ao plástico após 6 horas de semeadura nas garrafas de cultura celular. Após 24 horas de semeadura, havia cerca de 10 vezes mais célula do TA abdominal aderida em relação ao TA facial e após 5 dias, as CEM do TA facial eram mais confluentes do que as do TA abdominal (Figura 12). Ambas as CEM apresentaram morfologia fusiforme 24 horas após a semeadura.

Figura 12. Morfologia celular das células isoladas do TA facial e do abdominal.

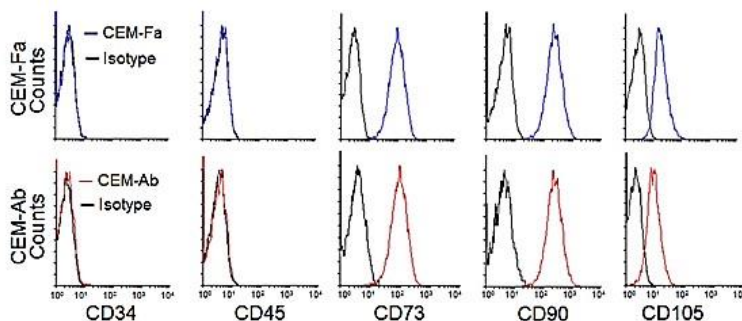
Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase das células aderentes derivadas da do TA facial (CEM-FA) e do abdominal (CEMAB) após 5 dias de semeadura. Ambas as células foram aderentes ao plástico e mantiveram a morfologia fusiforme durante o cultivo. Escala representa 200 µm.



6.2.2. Presença de marcadores de fenótipo mesenquimal

A presença das biomoléculas de superfície da membrana celular CD73, CD90 e CD105 é um dos requisitos necessários para a caracterização mesenquimal das CEM. Além disso, menos de 2% da população celular amostral analisada deve ser positiva para os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 (Dominici *et al.*, 2006)). Nossos resultados mostraram que as células de ambas as fontes do TA foram positivas para CD73, CD90 e CD105 (Figura 13). A presença de células positivas para CD34 e CD45 foi detectada abaixo de 2%.

Figura 13. Caracterização imunofenotípica das CEM. Representação em histogramas de perfil imunofenotípico das amostras submetidas à citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD34-PE, CD45-FITC, CD90-FITC, CD73-PE, CD105-PerCP em um experimento representativo. As cores azuis representam as CEM-TA-FA e as cores vermelhas representam as CEM-TA-AB. CEM-FA: CEM - TA faciais; CEM-AB: CEM-TA abdominais.



A expressão dos marcadores CD73 e CD90 foi equivalente nas CEM das duas fontes analisadas, com proporções de 95% em ambas para CD73 e 96% e 92% para o CD 90 nas CEM da face e nas CEM do abdômen, respectivamente. Entretanto, o marcador CD105 foi imunodetectado em maior proporção nas amostras de CEM-TA faciais (90%) em comparação às abdominais (80%). Os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 foram encontrados em proporções inferiores a 2%. Este perfil de expressão se manteve constante de P4 até p10.

6.2.3. Capacidade de diferenciação para fenótipos mesenquimais

Seguindo as análises de caracterização mesenquimal, a seguir foi analisada a potencialidade de diferenciação celular para fenótipos mesodermiais. Os resultados mostraram que tanto as CEM do TA facial quanto do abdominal apresentaram potencial para diferenciação nos fenótipos adipocítico, osteocítico e condrocítico conforme detalhado abaixo.

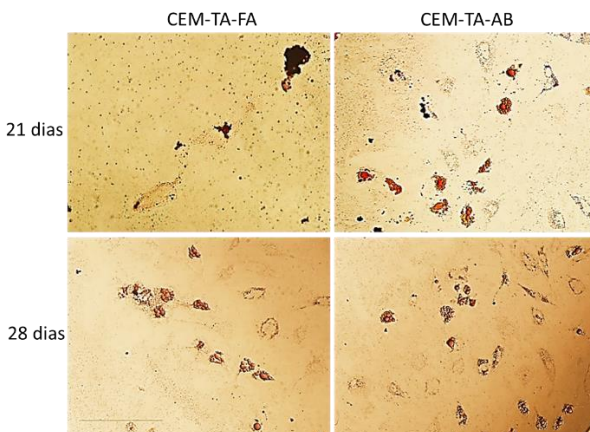
6.2.3.1. Curva de diferenciação para o fenótipo adipocítico

Ao longo dos 21 dias de tratamento com meio de diferenciação adipogênica, as CEM de ambas as fontes de TA alteraram progressivamente a morfologia fusiforme fibroblastóide para outra mais arredondada e passaram a apresentar lóculos lipídicos corados com Oil Red. Algumas células de ambas as fontes de TA mostraram um único e

grande lóculo de lipídio que ocupava todo o volume celular, característico de adipócitos maduros.

No 12^a dia de tratamento com meio adipogênico enquanto as CEMTA da face começaram a demonstrar algumas poucas células com lóculos de lipídio maiores, as CEM-TA do abdômen já apresentavam diversas células com este perfil. O controle negativo (mantido na ausência do meio de diferenciação adipogênica) de ambas as CEM não apresentaram alteração da morfologia ou acúmulo de lipídios em seu citoplasma durante os 21 dias de observação (Figura 14).

Figura 14. Diferenciação adipogênica. Imagens representativas em microscópio de luz das CEM mantidas em meio indutivo adipogênico. Células com acúmulo de lipídio corado em vermelho com Oil Red aos 12 e 21 dias de tratamento. Inseto: controle (células mantidas na ausência do meio indutivo). Barra: 200 μ m. CEM-FA: CEM -TA faciais; CEM-AB: CEM-TA abdominais.

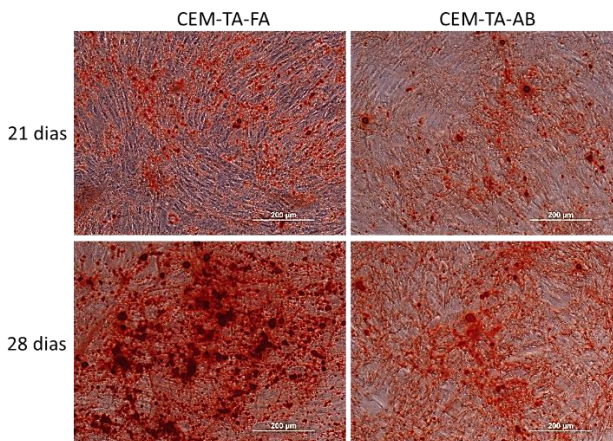


O ensaio de diferenciação adipogênica revelou que células coradas com *Oil Red* começaram a ser observadas no 3^o dia de tratamento com meio indutivo de diferenciação adipogênica nas CEM-TA abdominais e este ocorreu apenas no 6^a dia nas CEM-TA faciais. Foi observada maior quantidade de células com fenótipo adipocítico nas culturas de CEM-TA abdominais em relação às faciais durante os 21 dias de tratamento (Figura 14). No 21^a dia de tratamento com meio indutor de diferenciação adipogênica foi encontrado aproximadamente 2,3 vezes mais adipócitos na cultura de CEM-TA abdominal do que na cultura de CEM-TA facial. Esses resultados sugerem que as CEM-TA abdominais apresentam maior potencial de diferenciação para o fenótipo adipocítico do que as CEM-TA faciais.

6.2.3.2. Potencial de diferenciação para o fenótipo osteocítico.

Os resultados obtidos nos ensaios de diferenciação osteogênica mostraram que durante os 28 dias de tratamento com meio osteogênico tanto as CEM-TA faciais quanto as abdominais apresentaram matriz extracelular corada com Vermelho de Alizarina que tem afinidade a deposição de sais de cálcio, o que não foi observado nas culturas controle, mantidas na ausência do meio indutivo (Figura 15).

Figura 15. Diferenciação osteogênica. Imagens representativas em microscópio de luz das CEM mantidas em meio indutivo osteogênico aos dias 21 e 28 de tratamento. Inserto: controle (células mantidas na ausência do meio indutivo). A matriz extracelular mineralizada é corada com Vermelho de Alizarina indicando a diferenciação osteogênica. Barra: 500µm. CEM-FA: CEM -TA faciais; CEMAB: CEM-TA abdominais.

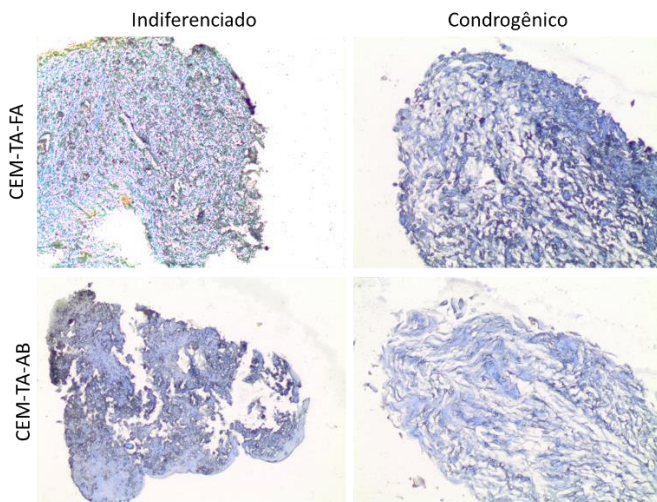


O ensaio de diferenciação osteogênica revelou que depósitos de sais de cálcio na matriz extracelular demonstrada pela coloração com Vermelho de Alizarina iniciou no 18^a dia de tratamento nas culturas de CEM-TA faciais e enquanto estes só ocorreram no 21^a dia nas culturas de CEM-TA abdominais (Figura 15). A maior intensidade da coloração da matriz extracelular foi estatisticamente significante maior nas CEM-TA faciais durante todo o tempo de tratamento, sendo a diferença de 1, 6 vezes no 27^a dia. Estes resultados sugerem que as CEM-TA faciais apresentam maior potencial de diferenciação para o fenótipo osteocítico do que as CEM-TA abdominais.

6.2.3.3. Potencial de diferenciação para o fenótipo condrocítico

A presença do fenótipo condrocítico foi analisado por meio do potencial de formação de *pellet* condrogênico e pela coloração com Mallory cuja cor azul indica depósito de colágeno. Os resultados dos ensaios de diferenciação condrogênica mostraram que tanto as CEM do grupo controle quanto as do grupo tratadas com meio condrogênico formaram *pellets*, no entanto, somente no grupo tratado foi verificado um *pellet* grande e bem delimitado tipicamente condrogênico, porém muito maiores nessas últimas. Para verificar a presença de colágeno nos *pellets* foi comprovada após realização dos cortes histológicos e coloração com Mallory (Figura 16). Em conjunto esses resultados demonstram que as CEM de ambas a fonte de TA apresentam naturalmente potencial condrogênico, estimulado pelo meio indutivo específico.

Figura 16. Diferenciação condrogênica. Cortes histológicos dos *pellets* corados com Mallory. Barra: 1cm (A) e 50 μ m (B). CEM-FA: CEM -TA faciais; CEMAB: CEM-TA abdominais.

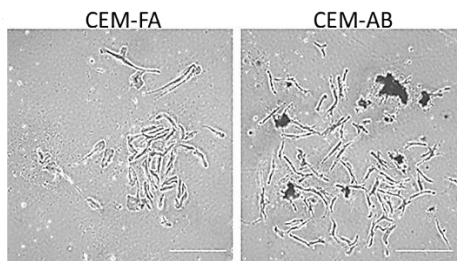


6.3. ANÁLISE DA CAPACIDADE DE FORMAR COLONIAS FIBROBLASTOIDES (CFU-F)

A capacidade de formar CFU-F é indicativo da presença (quantidade) de CT/progenitoras ((Dominici *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2006)). Nossos resultados demonstraram que ambas as CEM apresentam capacidade de formar CFU-F (Figura 17) sendo as faciais

com maior eficiência clonal, porém menor tamanho de colônia (1,4 vezes menos células por colônia). Este resultado é coerente com o anterior e sugere que apesar do menor potencial proliferativo, a população de CEM-TA facial apresentou maior proporção de células com características de CT ou progenitoras. Por fim, é importante ressaltar que foi observado maior espaçamento entre as células que compõem o CFU-F das CEM-TA do abdômen do que as células que compõem o CFU-F das CEM-TA da face, o que pode sugerir maior tendência de migração celular no primeiro caso.

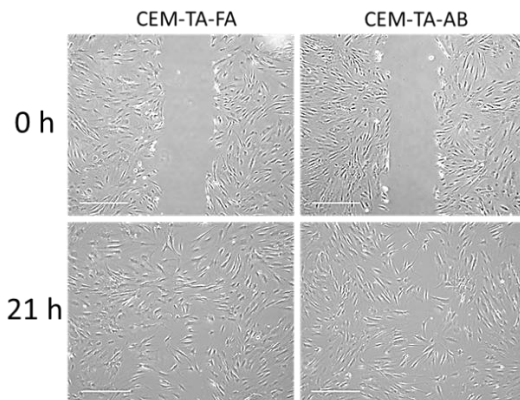
Figura 17. Capacidade de formar CFU-F. Fotomicrografias representativas de unidades formadoras de colônias (CFU-F) a partir de CEM isoladas do TA facial e do abdominal após 5 dias de cultivo celular em baixa densidade. Representação gráfica da eficiência das CEM do TA facial e do abdominal para formar CFU-F. Barra: 200 μ m.



6.4 ANÁLISE DE MIGRAÇÃO CELULAR

Uma importante característica das CEM é a capacidade migratória (De Becker & Riet, 2016). Para avaliar esta característica as CEM-TA, após atingirem confluência de 80%, foram tratadas com Mitomicina C para inibir a proliferação celular e submetidas a uma lesão na monocamada. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as CEMTA apresentam capacidade equivalente de migração celular *in vitro* fechando a lesão após 21hs (Figura 18).

Figura 18. Migração celular. Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase de CEM-TA faciais (CEM-FA) e abdominais (CEM-AB) entre 0 e 21 horas após a lesão na monocamada celular (A). Representação gráfica da porcentagem de fechamento após 21 horas do procedimento de raspagem da monocamada. CEM-FA: CEM -TA faciais; CEM-AB: CEM-TA abdominais. Barra: 500 μ m.



6.5. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE CELULAR DURANTE A EXPANSÃO EM CULTIVO

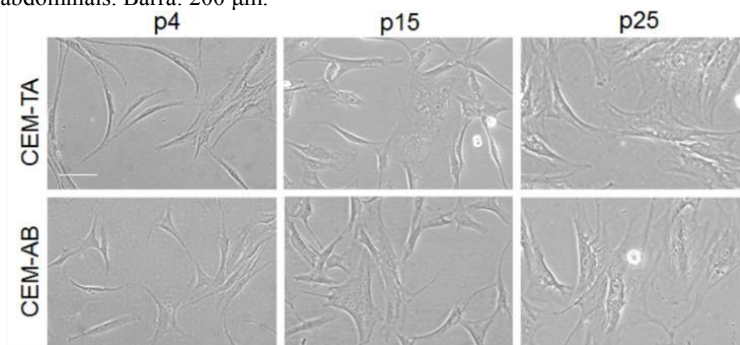
A eficiência da terapia celular depende da integridade genética das células. Células com instabilidade genética podem adentrar em processos de apoptose, senescência ou neoplasia celular que em todos os casos comprometem o sucesso terapêutico (Afonso Cornélio; Batistuzzo De Medeiros, 2014; Young; Black, 2004). Neste sentido, avaliamos a integridade das CEM durante a sua expansão em cultura. Em nossos experimentos, as células de ambas as fontes de TA demonstram perfis similares de senescência celular e de acúmulo de lesão no DNA, porém diferiram no perfil de anomalias nucleares adquiridas durante a expansão celular. Os resultados são descritos mais detalhadamente a seguir.

6.5.1. Senescência celular

A senescência celular *in vitro* pode ser influenciada pela fonte do tecido doador, mitoses sucessivas e/ou por danos acumulados durante a expansão (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; Wagner *et al.*, 2008). A análise da curva de senescência celular demonstra que ambas as CEM-TA apresentaram de forma equiparada sinais de senescência celular (Figura 19). Por volta da passagem 15 as CEM

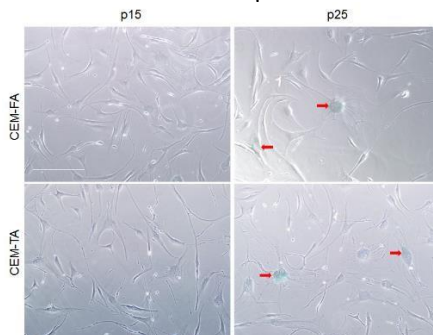
obtidas do TA facial e do TA abdominal demonstraram presença de células com morfologia tipicamente senescente como o aumento da área citoplasmática, está apresentando muitas vesículas, fibras de estresse e prolongamentos citoplasmáticos (Figura 19). Em passagens altas (23-28) a cultura celular de ambas as CEM demonstraram um aumento desse perfil senescente e redução do fenótipo fusiforme (Figura 19). A capacidade de proliferação celular de ambas as CEM se manteve em crescimento exponencial até a passagem 10. Após esta passagem as células reduziram seu crescimento exponencial e adentraram a fase platô por volta da passagem 25.

Figura 19. Perfil de senescência celular a longo tempo de cultura celular. Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase de CEM-TA faciais (CEM-FA) e abdominais (CEM-AB) durante a realização da curva de senescência celular. Surgimento e aumento de células com alteração morfológica nas passagens 15 e p25, respectivamente. CEM-FA: CEM -TA faciais; CEM-AB: CEM-TA abdominais. Barra: 200 μ m.



A senescência celular foi avaliada ainda pelo acúmulo da enzima galactosidase ácida (SA-b-gal) que é associada à senescência (*Senescence Associated beta-gal*) (B. Y. Lee *et al.*, 2006; Terzi *et al.*, 2016). Um número reduzido de células coradas foi observado em passagens altas (p25) ausentes das passagens baixas (não representadas) ou médias (p15) (Figura 20). Esses resultados sugerem que apesar da redução na taxa de dobramento populacional e início de alteração morfológica em passagens médias, a senescência inicia em um número bem reduzido de células em passagens altas indicando que as CEM-TA de ambas as fontes são resistentes à senescência.

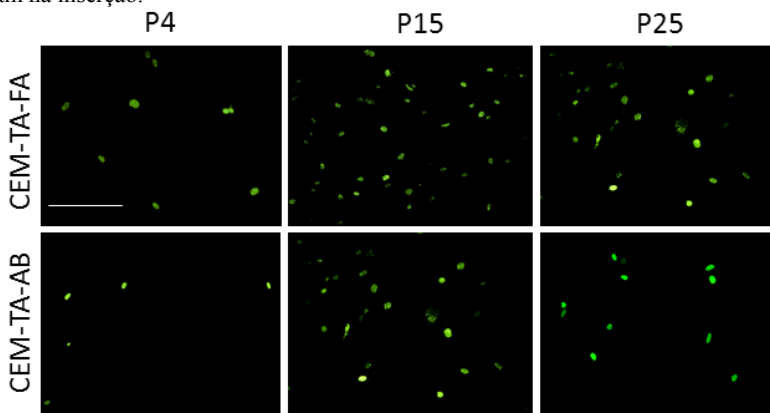
Figura 20. Acúmulo de β -galactosidase ácida. Imagens representativas em microscópio de contraste de fase das CEM -TA faciais (CEM-FA) e abdominais (CEM-AB) após o ensaio de SA-b-gal. Células positivas coradas em verdes e sinalizadas por flechas vermelhas. Barra: 100 μ m.



6.5.2. Integridade genética

Para verificar se a senescência celular estaria relacionada com acúmulo de danos no DNA foi realizado então ensaio de imunocitoquímica para investigar a presença da histona γ H2AX, conhecido marcador de lesão no DNA (Lopez *et al.*, 2012; Terzi *et al.*, 2016; Ziebarth *et al.*, 2013). Nossos resultados mostraram que as CEM em todas as passagens, baixa (p3-8), média (p15-20) e alta (p23-28) apresentaram focos de γ H2AX (Figura 21).

Figura 21. Presença de γ H2AX. Imagens representativas de imunocitoquímica para γ H2AX (núcleos corados em verde) nas CEM-TA faciais e CEM-TA abdominais em passagens: baixa (p4), média (p15) e alta (p25). Barra: 50 μ m e 200 μ m na inserção.



O número total de células positivas para DAPI foi utilizado para quantificar a população de CEM-TA faciais e abdominais nas passagens celulares (baixas, médias e altas) e relacionar ao acúmulo de γ H2AX. Não foram observadas diferenças no número total de células positivas para DAPI entre as fontes e durante as diferentes passagens. No entanto, foi verificado uma tendência de aumento no número CEM do TA facial em passagens baixas.

A quantificação das células positivas para γ H2AX revelou uma porcentagem de cerca de 30% nas CEM-TA faciais e 18% nas abdominais em passagens baixas, com diferença não estatística de 1,6 vezes entre elas. Em passagens médias, no entanto, cerca de 99% de ambas as CEM eram positivas para este marcador, o que pode sugerir predisposição à imortalização já que também foi observada maior proliferação nestas passagens. Nas passagens mais altas, houve redução da porcentagem de células positivas para γ H2AX em ambas as CEM para cerca de 37.5% nas CEM-TA da face e cerca 50% nas CEM-TA abdominais.

Em seguida, buscamos relacionar a senescência celular e lesão no DNA com anomalias nucleares das CEM. Para isto, utilizamos o ensaio de bloqueio de citocinese pela citocalasina B que gera células binucleadas e assim, possibilita a visualização de anomalias nucleares. Inicialmente, buscamos identificar o índice de divisão nuclear (IDN) das CEM analisadas (M Fenech *et al.*, 2011; Michael Fenech, 2006) que

possibilita medir o potencial de células proliferativas da fração viável. Para isto é necessário contar um mínimo de 600 células e aplica-las no seguinte cálculo: $IDN: (M1+2M2+3M3+4M4) / N$. Onde:

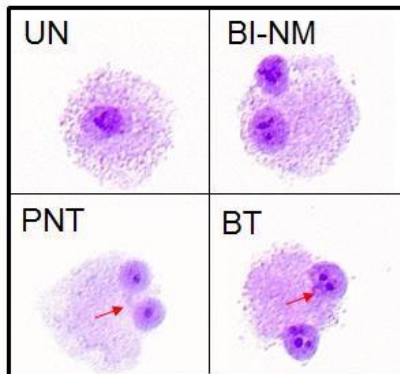
□ $NDI = 1$ Significa que todas as células viáveis não se dividiram durante o bloqueio da citocinese.

- $NDI = 2$ Significa que todas as células viáveis eram binucleadas, ou seja, se dividiram ao menos uma vez durante o bloqueio da citocinese.
- $NDI > 2$ Significa que uma grande proporção das células viáveis completou mais do que uma divisão nuclear durante o bloqueio da citocinese.

Em nossos resultados obtivemos o $NDI = 2,5$ para as passagens baixas de ambas as fontes de CEM e $NDI = 1,5$ para as passagens altas de ambas as fontes de CEM, demonstrando que estavam muito proliferativas e pouco proliferativas, respectivamente, durante o tratamento com citocalasina B. Após, avaliamos as anomalias presentes nas células.

Pela análise de células binucleadas pode-se inferir a presença de anomalias cromossômicas. Nossos resultados mostraram que ambas as CEM apresentam anomalias nucleares em todas as passagens (Figura 22). As alterações nucleares visualizadas foram broto (BT) e ponte núcleo citoplasmáticas (PNT). Não foram observadas células binucleadas com micronúcleos.

Figura 22. Anomalias nucleares avaliadas. Imagens representativas em microscópio de luz das anomalias avaliadas nas células tratadas com citocalasina B. Célula uninucleada (UN), célula binucleada (BI-NM), célula binucleada com ponte núcleo-citoplasmática (PNT) e células binucleada com broto (BT). Anomalias nucleares indicadas por fechas em vermelho. Aumento de 400x.



Segundo nossos resultados, ambas as CEM apresentaram baixa frequência de células binucleadas com alterações nucleares em todas as passagens analisadas. A anomalia do tipo broto (BT) foi estatisticamente similar nas CEM-TA faciais e abdominais em passagens altas com tendência a aumento nas CEM-TA faciais em passagens baixas. É importante destacar o aumento de cerca de 2x na frequência dessa anomalia nas passagens altas das CEM-TA abdominais em relação as passagens baixas apesar de não sido detectada diferença estatisticamente significativa. Já a anomalia ponte nucleocitoplasmática (PNC) foi observada em frequência similar entre as CEM em passagens baixas (0,04% para as faciais e 0,025% para as abdominais). No entanto, a proporção dessa anomalia foi 2 vezes maior nas CEM do TA abdominal do que nas CEM do TA facial em passagens altas.

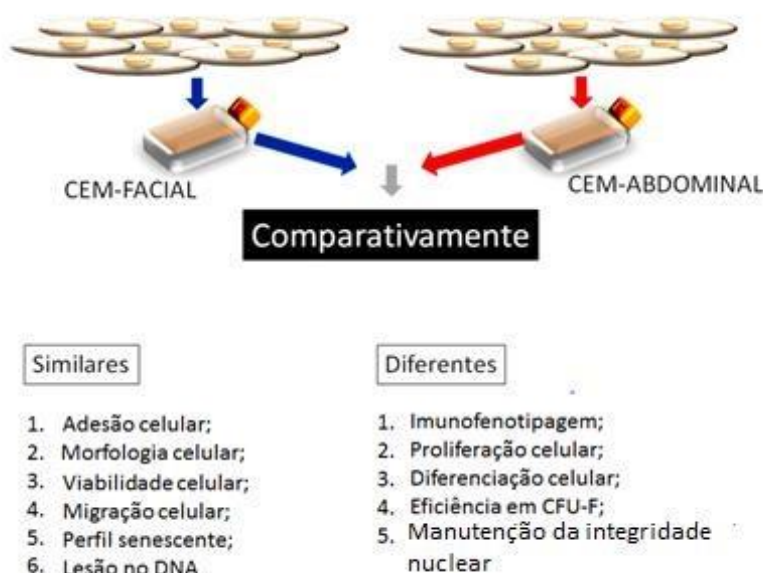
Em conjunto, podemos concluir que as CEM isoladas tanto do TA facial quanto do TA abdominal demonstram baixa frequência de anomalias nucleares podendo ser consideradas seguras quanto a ocorrência de aberrações cromossômicas. Porém, durante a expansão celular, as CEM do TA abdominal acumulam maior anomalias nucleares do que as CEM do TA facial.

7. DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais (CEM) apresentam grande potencial para a regeneração de tecidos e órgãos lesados, bem como para modular as respostas imunológicas (Dai, Wang, Samanipour, Koo, & Kim, 2016). Além disto, estas células podem ser obtidas de vários tecidos, o que facilita o seu manuseio (Bhang *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2016). Trabalhos anteriores do nosso grupo isolaram CEM do ligamento periodontal (Coura *et al.*, 2009) e da derme humana obtidas da região facial (Jeremias *et al.*, 2014) e da abdominal (ZOMER trabalho em andamento). Testes pré-clínicos de nosso grupo, demonstram que estas células têm efeito benéfico no processo cicatricial cutâneo (Jeremias *et al.*, 2014), principalmente, por promover maior vascularização, reepitalização e depósito de matriz extracelular (Jeremias *et al.*, 2014). Neste trabalho, buscamos aumentar nosso leque de fontes de CEM. Uma notável fonte destas células é o tecido adiposo (TA) (Tsuji *et al.*, 2014; T. Wang *et al.*, 2015). Este tecido é amplamente distribuído no organismo, de fácil obtenção e rico em CEM (Ogura *et al.*, 2014). No entanto, o TA apresenta inúmeras distinções de acordo com sua localização anatômica (Chau *et al.*, 2014; Dani & Billon, 2012; Wajchenberg, 2000) que podem afetar suas propriedades terapêuticas (Bian *et al.*, 2016; Sowa *et al.*, 2013). Fato que parece pouco explorado, visto que a grande maioria dos trabalhos utiliza o TA humano de origem abdominal como fonte de CEM (Bian *et al.*, 2016; Ogura *et al.*, 2014; Zuk *et al.*, 2002). Recentemente aumentou o interesse acerca das propriedades terapêuticas destas células obtidas de outras localidades (Bian *et al.*, 2016; J. Y. Lee, Chen, Shaw, & Chang, 2016; Sowa *et al.*, 2013; W. Z. Wang *et al.*, 2014). No entanto, o TA facial humano é ainda pouco explorado como fonte de CEM. Neste trabalho analisamos comparativamente as características de CEM isoladas de duas fontes do TA humano: o facial e abdominal. Nossos resultados demonstraram que o TA obtido de ambas as fontes apresentam células contendo os critérios mínimos estipulados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para obtenção de CEM (Dominici *et al.*, 2006), com capacidade de aderência ao substrato plástico, morfologia fusiforme e padrão fenotípico mesenquimal (expressão de CD73, CD90, CD105 e ausência de CD34 e CD45), potencial de diferenciação para tipos celulares mesenquimais (adipocíticos, osteocíticos e condrocíticos) e capacidade para formar CFU-F. Portanto, estas células apresentam potencial clonogênico e de diferenciação celular. Ademais, as CEM isoladas de ambas as fontes mostraram propriedades de proliferação e de migração celular. Em conjunto, estes resultados sugerem que o TA facial é uma

fonte alternativa de CEM. Os resultados mostraram ainda que as CEM da face e do abdômen diferem entre si em algumas características: as faciais apresentaram maior capacidade proliferativa, maior percentual de células positivas para CD105, maior potencial para a diferenciação osteogênica e maior eficiência em formar CFU-F do que as abdominais. No entanto, ambas são resistentes a danos o que as torna equiparadamente promissoras para aplicações terapêuticas (Figura 23).

Figura 23. Esquematização dos resultados obtidos das análises de CEM do TA facial e do TA abdominal.



Fonte: Autora do trabalho (2017).

7.1. O RENDIMENTO INICIAL DE OBTENÇÃO DE TA NÃO INTERFERE NO RENDIMENTO DE CÉLULAS APÓS EXPANSÃO CELULAR

O TA pode ser obtido por várias técnicas cirúrgicas e de várias localidades anômicas. O TA subcutâneo lipoaspirado, comumente obtido da região abdominal, é reconhecido por seu alto rendimento de CEM o que possibilita a aplicação direta destas células ao paciente, sem necessitar passar por expansão *in vitro* (Bian *et al.*, 2016). Portanto, representa uma vantagem financeira e também de segurança, pois evita maiores danos celulares causados por manuseio e exposição a um

ambiente artificial como a cultura celular (Afonso Cornélio, *et al*, 2014; Bian *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2014). De fato, após 24 horas, foi observado muito mais células isoladas de origem abdominal aderidas ao substrato plástico da garrafa de cultura do que as células obtidas região facial. Entretanto, esse resultado não necessariamente significa que o TA abdominal proporcionou maior quantidade de CEM do que o TA facial (Kim *et al.*, 2013; Russo *et al.*, 2014).

O TA apresenta diversas distinções de acordo com sua deposição anatômica (Badalà, *et al* 2008; Ibrahim, 2010). Inúmeros trabalhos reportam que a cultura celular obtida do TA, majoritariamente obtido por lipoaspiração ou abdominoplastia abdominal, apresenta uma população celular formada por diferentes subpopulações celulares (Bian *et al.*, 2016; Ogura *et al.*, 2014). Muitas vezes com diferentes graus de potencialidade e comprometimentos celulares (Bian *et al.*, 2016; Sciences & Clinic, 2014; W. Z. Wang *et al.*, 2014). Tem sido relatado que o TA visceral apresenta maior proporção de células pró-inflamatórias, adipócitos e menos células indiferenciadas do que o TA subcutâneo abdominal (Russo *et al.*, 2014; Wajchenberg, 2000). Segundo Iwen KA e colaboradores (2014), as CEM isoladas do TA abdominal e da região dos glúteos diferem no potencial de diferenciação celular. Esse autor demonstrou que as CEM do TA abdominal apresentaram menor potencial para diferenciação em adipócitos e osteócitos do que as CEM obtidas do TA dos glúteos. Portanto, há evidências de que as CEM são distribuídas de forma desigual no tecido adiposo subcutâneo e que a origem do TA pode influenciar os resultados clínicos (Choudhery, Badowski, Muise, Pierce, & Harris, 2015; Russo *et al.*, 2014).

A grande maioria dos estudos comparativos de fontes de CEM do TA se focam no tronco, principalmente entre o subcutâneo e o visceral (Dai *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013; Russo *et al.*, 2014; Sowa *et al.*, 2013), sendo pouco exploradas as diferenças do tronco e para outras localidades como de TA como a face (Bian *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013). O presente trabalho demonstrou que apesar da diferença de rendimento inicial, ambas as culturas celulares de CEM do TA facial e do abdominal apresentaram células fusiformes e aderentes ao substrato plástico das garrafas de cultura que em uma semana entraram em confluência de cerca 80%. Portanto, apesar da obtenção inicial maior quantidade de células do TA abdominal, essa diferença não se manteve após uma semana de cultivo e durante toda expansão celular.

7.2. INDEPENDENTE DA FONTE DO TA, FACE OU ABDÔMEN, AS CÉLULAS ISOLADAS DESTE TECIDO APRESENTAM CARACTERÍSTICAS DE CEM

As células obtidas de ambas as fontes do TA, face e abdômen, apresentaram perfil imunofenotípico característico de CEM (Dominici *et al.*, 2006). É importante elucidar que o termo mesenquimal gera confusões acerca de seu conceito, induzindo erroneamente associação a um tipo celular (Kalluri & Weinberg, 2009; Zeisberg & Neilson, 2009). A palavra mesenquimal refere-se a um estado da célula caracterizado pela morfologia com eixo alongado (comumente associado a morfologia fibroblastóide) e por alta capacidade migratória e de invasão celular (Kalluri; Weinberg, 2009, Zeisberg; Neilson, 2009). Essas características são resultado, da organização de integrinas em sítios focais de adesão celular e ao citoesqueleto rico em microfilamentos e pobre em filamentos intermediários (Kalluri & Weinberg, 2009; Valluru, Staton, Reed, & Brown, 2011). Dessa forma, as células conseguem aderir de forma dinâmica e polarizada na matriz extracelular, respondendo às suas sinalizações (Kalluri & Weinberg, 2009). Simultaneamente a esses eventos há a substituição de E-caderinas por N-caderinas (Zeisberg & Neilson, 2009). No presente trabalho essas moléculas não foram analisadas, porém nossos resultados mostram que as células obtidas do TA facial e abdominal apresentaram capacidade de adesão ao substrato plástico das garrafas de cultura e apresentaram a típica morfologia fusiforme, como descrita anteriormente (Dominici *et al.*, 2006). Outro requisito necessário para avaliar o estado mesenquimal, a motilidade celular, foi avaliado neste trabalho (De Becker & Riet, 2016; Zeisberg & Neilson, 2009). Nossos resultados mostraram que ambas as células analisadas apresentaram de modo equivalente alta capacidade de migração celular. Assim, independente da fonte do TA, as células apresentaram capacidade de aderência celular, morfologia fusiforme e habilidade de motilidade, três requisitos do perfil de células mesenquimais (Dominici *et al.*, 2006; Zeisberg & Neilson, 2009). Outra propriedade mesenquimal é o aumento da razão de marcadores mesenquimais (CD90, CD73 e CD105 dentre outros) em detrimento aos hematopoiéticos e endoteliais como CD34 (Dominici *et al.*, 2006; Zeisberg & Neilson, 2009). Novamente, a grande maioria das células de ambas as fontes expressaram os marcadores mesenquimais e menos de 2% eram positivas para os marcadores hematopoiéticos e endoteliais. Sendo assim, as células isoladas do TA facial e do abdominal utilizadas neste trabalho foram

consideradas mesenquimais e denominadas de CEM do TA (também denominadas de CEM-TA) (Dominici *et al.*, 2006).

No entanto, o percentual de células positivas para CD105 foi distinto entre as culturas da face e do abdômen. Cerca de 80% das CEM do TA abdominal foram positivas para esse marcador comparado a mais de 90% das células do TA facial. O CD105 (endogлина) é uma glicoproteína transmembranar homodimérica que atua como co-receptor auxiliar para o complexo de proteínas receptoras da superfamília TGF- β (transforming growth factor beta, em inglês) (J. Xu, Lamouille, & Derynck, 2009), uma citocina pleiotrópica envolvida na regulação da proliferação, diferenciação, migração e adesão celular (ARUFE *et al.*, 2009). Assim, o CD105 está relacionado com proliferação e a motilidade celular (Pomeraniec, Hector-Greene, Ehrlich, Blobe, & Henis, 2015; Valluru *et al.*, 2011). Várias possibilidades podem explicar o maior percentual de células CD105+ em nosso trabalho (Carrillo-Gálvez, *et al.*, 2013; Pomeraniec *et al.*, 2015; Ziebarth *et al.*, 2013). Esse marcador é altamente expresso em células endoteliais (Valluru *et al.*, 2011) e sendo o TA muito vascularizado, poderia estar havendo contaminação com células endoteliais (Bian *et al.*, 2016; Dani & Billon, 2012). Porém, os marcadores de células endoteliais CD34 e de células hematopoiéticas CD45 foram equiparadamente reduzidos em ambas as culturas de CEM (Dominici *et al.*, 2006), contrariando esta hipótese. Ishibashi (2010), relatou que células progenitoras do ligamento periodontal respondem a BMP durante a osteogênese por uma via única dependente de CD105 (Ishibashi *et al.*, 2010). Outros trabalhos relataram que baixa expressão de CD105 em cultura de CEM aumentam seu potencial de diferenciação osteocítica (Carrillo-Gálvez, *et al.*, 2013; Ishibashi *et al.*, 2010). Em outro trabalho, foi verificado que células positivas para CD105 demonstraram maior capacidade para gerar adipócitos do que osteócitos (Beederman *et al.*, 2013). Já Banas (2012) relatou que a cultura de CEM CD105+ é mais homogênea e demonstra maior potencial de diferenciação para linhagens mesenquimais como adipócitos, osteócitos, condrócitos e hepatócitos. Em 2014, Maleki e colaboradores demonstraram que CT do folículo piloso CD105+ tinham maior potencial em gerar osteócitos do que as negativas para este marcador (Maleki *et al.*, 2014). Em nosso trabalho, observamos que as CEM do TA abdominal demonstraram maior potencial de diferenciação para o fenótipo adipocítico do que as CEM do TA facial. Em contrapartida, as CEM do TA facial foram mais eficientes para gerar osteócitos. Desse modo, a literatura é controversa

havendo necessidade de outros trabalhos para entender o papel de CD105 em CT.

As CEM deste trabalho foram isoladas do TA e portanto, pode haver uma alta percentagem de células progenitoras de adipócitos (lipoblastos ou pré-adipócitos), principal célula deste tecido (A. Park *et al.*, 2014). O lipoblasto no seu estado mais indiferenciado é facilmente confundido com as CEM por apresentar características típicas de células mesenquimais como morfologia fusiforme, aderência ao plástico, marcadores mesenquimais como o CD90 e capacidade de proliferação, migração e diferenciação para adipócitos (Cawthorn, *et al.*, 2012; Hisaoka, 2014). Além disto, essas células são negativas para o CD105 (Cawthorn, *et al.*, 2012). Assim, é possível que a cultura de células obtidas do TA abdominal seja mais rica em célula progenitoras de adipócitos do que a cultura de células do TA facial que por sua vez possa ser mais rica em CEM mais indiferenciadas, o que poderia explicar a maior capacidade das CEM do TA abdominal em gerar adipócitos. Em apenas 3 dias em meios indutivos de diferenciação celular já era possível observar células contendo vacúolos com óleo, típico de adipócitos, confirmado pela coloração com Oil Red. Entretanto, o mesmo fenótipo só foi inicialmente observado no 6º dia de indução adipocítica nas culturas das CEM do TA facial. A análise da expressão de PPRaY-2 (marcador típico de lipoblastos) (Cawthorn, *et al.*, 2012) em ambas CEM por PCR-RT poderia validar esta hipótese.

Avaliamos ainda a potencialidade das CEM do TA em gerar osteócitos baseada na coloração com Vermelho de Alizarina (Jeremias *et al.*, 2014; Langenbach & Handschel, 2013). O meio osteogênico utilizado é composto por dexametasona, ácido ascórbico e o β -glicerofosfato (Langenbach & Handschel, 2013). O dexametasona ativa a expressão de Runx-2 (fator mestre da via de diferenciação osteogênica) via Wnt/ β catenina (X. Xu *et al.*, 2014). O ácido ascórbico induz a expressão de colágeno I aumentando sua concentração na matriz extracelular, permitindo maior interação das integrinas do osteoblastos e maior sinalização para a manutenção da expressão de Runx-2 (Langenbach & Handschel, 2013). Já o β -glicerofosfato age como fonte de fosfato necessário para produzir o mineral hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que é corado pelo Vermelho de Alizarina, e como modulador da expressão de genes da via osteogênica, como osteopontina e BMP-2 (Karp & Leng Teo, 2009; Langenbach & Handschel, 2013). Entretanto, o β -glicerofosfato pode estimular a mineralização distrófica onde há deposição de sais de cálcio, produto de morte celular, portanto, diferente da deposição de hidroxiapatita

mineralizada na matriz extracelular que ocorre na diferenciação osteocítica (Langenbach & Handschel, 2013). Em comum, estes dois depósitos de sais de cálcio tem a afinidade por Vermelho de Alizarina que os cora indistintamente (Langenbach & Handschel, 2013). Assim, nossos resultados de coloração com Vermelho de Alizarina podem não refletir o real potencial de diferenciação para o fenótipo osteocítico das CEM do TA facial e do abdominal pois o meio artificial indutor de diferenciação celular pode gerar danos celulares que inviabilizam as células e ainda pode induzir a apoptose (Afonso Cornélio, *et al*, 2014; Langenbach, *et al*, 2013; Young, *et al*, 2004). Para maiores esclarecimentos acerca deste potencial de diferenciação celular seria importante avaliar a expressão de fatores da via de diferenciação osteocítica, como o Runx-2, e também marcadores de morte celular como caspase 3 que marca apoptose ou Iodeto de propídio que marca necrose (Olivieri *et al.*, 2015; W. Z. Wang *et al.*, 2014).

Já o potencial para o fenótipo condrócito foi observado nas CEM de ambas às fontes de TA. Ambas as células formaram *pellets* arredondados após 30 dias de tratamento com meio condrogênico (Somoza, Welter, Correa, & Caplan, 2014). Além de serem coradas com Mallory que cora de azul o colágeno. Entretanto, esse corante tem afinidade por vários tipos de colágenos (Tsai *et al.*, 2011). O principal colágeno da matriz extracelular condrogênica é o tipo II. Porém, pode haver diferentes concentrações de outros tipos, como do tipo I e III durante o processo condrogênico (Somoza *et al.*, 2014). Além disto, o colágeno também é secretado por CEM (Jeremias *et al.*, 2014; Sui *et al.*, 2016). No entanto, houve diferenças expressivas entre os grupos tratados e não tratados com meio de diferenciação condrogênica. No grupo tratado de ambas as CEM foi formado um pellet tipicamente condrogênico com um diâmetro de aproximadamente de 10 vezes maior que do grupo controle (não tratado com meio condrogênico). As análises comparativas entre as CEM de ambas as fontes não mostraram diferenças perceptíveis do potencial de diferenciação condrogênica entre as células.

Trabalhos recentes que visam a comparação de CEM isoladas do TA por diferentes técnicas de cirurgias plásticas demonstrou que a técnica cirúrgica para a obtenção do TA influencia no potencial de diferenciação celular das CEM (Bian *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013). Bian e colaboradores demonstraram que a dissecação do TA que pode ser realizada por técnicas como a abdominoplastia e a ritidoplastia, possibilitou isolar CEM com maior potencial para a diferenciação adipocítica, osteocítica e condrocítica do que as CEM isoladas do TA

obtido por lipoaspiração (Bian *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Sowa *et al.*, 2013). No entanto, o lipoaspirado, principalmente do abdômen, proporciona maior quantidade de células de forma mais imediata, sem precisar passar para expansão celular para aplicações terapêuticas (Bian *et al.*, 2016). Todavia, de acordo com o discutido anteriormente, o lipoaspirado pode ser muito heterogêneo e conter uma grande parcela de lipoblastos. Essa possibilidade poderia explicar a maior tendência para o fenótipo adipocítico, menor eficiência de formar CFU-F (considerado por muitos pesquisadores uma habilidade clonogênica) e proliferativa, típica de CT e menor capacidade proliferativa de CEM isoladas do TA abdominal (Hofer *et al.*, 2010). Nossos resultados da curva de dobramento celular acumulativo demonstraram que as CEM do TA facial apresentaram maior capacidade proliferativa do que as CEM do TA abdominal. Esse resultado pode estar associado com a maior expressão de CD105 na cultura de CEM do TA facial, como discutido acima. Isto porque CD105 está envolvido na via de sinalização de TGF β e este por sinal aumenta a capacidade de proliferação celular (Pomeraniec *et al.*, 2015; Valluru *et al.*, 2011; M.-K. Wang *et al.*, 2012).

7.3. AS CEM OBTIDAS DE AMBAS AS FONTES DE TA SÃO EQUIPARADAMENTE RESISTENTES A DANOS CELULARES.

O sucesso terapêutico das CEM é dependente de suas propriedades mesenquimais e de diferenciação celular, bem como também a segurança de sua aplicação. Durante a expansão celular as células estão expostas a diversos fatores que podem comprometer sua qualidade e segurança terapêutica (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; Berra, Menck, & Di Mascio, 2006). Esses fatores podem ser, por exemplo, a manipulação em cultura e as condições artificiais a longo tempo (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; Andreeva NV1, Zatsepina OG1, Garbuz DG1, Evgen'ev MB2, 2016; Olivieri *et al.*, 2015) que podem causar acúmulos de danos celulares e genéticos, induzindo a estados de senescência e morte celular ou maior predisposição a processos neoplásicos (Sharpless & Depinho, 2004). Para garantirmos a qualidade de CEM isoladas do TA facial e do TA abdominal, realizamos experimentos para analisar a senescência celular e a integridade genética destas células durante longo tempo em cultura.

O perfil senescente foi observado de forma equiparada em ambas as CEM. Tanto as culturas de CEM do TA facial quanto de CEM do TA abdominal apresentaram células maiores, mais larga e com muitas fibras

de estresse (Rodier & Campisi, 2011). Além disto, também foi observada redução da capacidade proliferativa após a expansão celular a longo tempo, típico de senescência replicativa (Rodier & Campisi, 2011; Terzi et al., 2016). Essas características de senescência surgiram nas passagens médias (p15-20) e foram mais expressivas durante as passagens altas (p23-28). Nas passagens altas, as CEM de ambas as fontes de TA apresentaram uma população mais homogênea com o perfil senescente.

A parada do ciclo celular pode indicar o estado de quiescência (parada reversível do ciclo celular) que reduz o metabolismo celular devido a um ambiente inapropriado, mas pode voltar ao ciclo celular quando as condições voltarem ao normal (Terzi et al., 2016), ou ainda indicar o estado senescente (parada irreversível do ciclo celular) em decorrência do excesso de lesões não reparadas (Rodier & Campisi, 2011; Terzi et al., 2016). No entanto, os nossos resultados do ensaio de SA-Bgal (*Senescence Associated beta-gal*) mostraram poucas células positivas para β -Galactosidase, um dos marcadores mais utilizados para identificar o estado senescente (B. Y. Lee et al., 2006; Rodier & Campisi, 2011). Porém, nem sempre se detecta esta enzima lisossomal em células senescentes (B. Y. Lee et al., 2006). Alguns trabalhos mostram que a expressão diferencial, micro RNAs e outros podem interferir na atividade desta enzima e impossibilitar a sua detecção mesmo em células claramente senescentes (B. Y. Lee et al., 2006; Terzi et al., 2016), ou pré-senescentes (Terzi et al., 2016). Em conjunto, nossos resultados indicam que em passagens baixas as CEM de ambas as fontes de TA são semelhantes nesse critério que pode estar relacionado ao estado de quiescência e/ou senescência celular. Para melhor conclusão, seriam necessários mais testes como a análise de moléculas de *check-point* do ciclo celular, como a p21 e p53 (Montagner & Costa, 2009; Rodier & Campisi, 2011; Terzi et al., 2016).

Coincidentemente, nas passagens médias houve um aumento de células positivas para γ H2AX, marcador que indica lesão no DNA e está associado ao perfil de senescência celular (RODIER, et al, 2011). No entanto, a presença de células positivas para este marcador foi reduzida nas passagens mais altas. O γ H2AX é uma variante fosforilada da histona H2AX (isotipo de H2A que juntamente com H2B, H3 e H4 participa do complexo nucleossomal) (Kuo & Yang, 2008; Lopez et al., 2012; Panich et al., 2016). Quando ocorre uma quebra na dupla fita de DNA a H2AX é fosforilada na serina 139, resultando na variante γ H2AX (KUO, et al, 2008). Esse último surge rapidamente e é um dos

primeiros sinalizadores para ativar o sistema de reparo de DNA (Kuo & Yang, 2008). Em nosso trabalho, as CEM de ambas as fontes de TA foram estatisticamente equiparadas quanto à presença deste marcador. Em passagens baixas (p410), aproximadamente 35% das CEM da face e 16% das CEM do abdômen foram positivas para γ H2AX. Portanto, em passagens iniciais as CEM do TA facial acumularam cerca de 2 vezes mais lesão no DNA do que as CEM do TA abdominal. No entanto, nossos dados apresentaram um enorme desvio estatístico que foi constante tanto nas triplicatas biológicas quanto nas triplicatas técnicas. Isso sugere que em passagens baixas as CEM do TA facial apresentaram alta variabilidade, que pode ser consequência de diferenças genéticas, fisiológicas e de hábitos dos indivíduos doadores do TA (Bian *et al.*, 2016; Jablonski & Chaplin, 2010; Visvader & Clevers, 2016). Desse modo, sugerimos para experimentos futuros aumentar o n amostral para obtenção de um resultado mais claro. No entanto, quando comparado entre as fontes de TA as CEM não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si. Já em passagens médias houve maior uniformidade de dados e também um expressivo aumento de células positivas para γ H2AX em ambas as CEM, aproximadamente 90% de todas as células de ambas as fontes de TA, sugerindo que por volta da passagem 15 as células estavam sob fortes agentes genotóxicos e clastogênicos (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; Kuo & Yang, 2008). Dentre esses agentes podemos citar a proliferação celular. Após sucessivas mitoses há perda do DNA telomérico que protege as células da instabilidade cromossômica (Shammas, 2011). A perda desse DNA pode predispor a quebras no DNA, sinalizadas pela γ H2AX (Kuo & Yang, 2008; Rodier & Campisi, 2011). Esse marcador também é observado sob condições de estresse oxidativo, comum durante a expansão celular. No entanto, nossos resultados também sugerem que as CEM analisadas demonstram uma alta capacidade para lidar com essas lesões. Essas células se mantiveram proliferando mesmo com quase 100% delas positivas para γ H2AX, só reduzindo o estado proliferativo em passagens altas. Poderíamos relacionar a alta porcentagem de CEM positivas para γ H2AX com a transformação celular, entretanto, ocorreu um declínio do processo de proliferação nas passagens altas o que não combina com o estado neoplásico (Rodier & Campisi, 2011; Shammas, 2011). Caso estas células estivessem entrando em um processo de transformação celular a fase platô claramente visualizada em passagens altas na curva de senescência não seria possível. É importante salientar que o γ H2AX é um sinalizador de lesão de DNA, não sendo necessariamente

indicativo de dano permanente já que estimula o sistema de reparo que pode ser totalmente eficiente (Kuo & Yang, 2008; Olivieri *et al.*, 2015). Os resultados obtidos da análise de γ H2AX em conjunto com os resultados da análise de senescência celular reforçam o entendimento de que as CEM podem estar entrando em estado de quiescência para evitar lesões no DNA ou entrando em senescência celular por acúmulo de danos não reparados ou por replicação.

A senescência celular normalmente está associada a instabilidade genética ou acúmulos de danos os quais devem ser evitados de serem passados adiantes em novas células (RODIER, *et al*, 2011; WALTERS, *et al*, 2016). Além das análises da presença de γ H2AX também buscamos analisar anomalias nucleares que podem sugerir aberrações cromossômicas (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; M Fenech *et al.*, 2011). A frequência de anomalias nucleares celulares é um importante indicativo de instabilidade cromossômica que pode comprometer a efetividade e segurança da aplicação terapêutica de CEM (Michael Fenech, 2007). Um ensaio muito utilizado para a análise destas anomalias é o ensaio de bloqueio de citocinese pela citocalasina B (CBMN), que foi utilizado neste trabalho. A citocalasina B bloqueia a polimerização do anel de microfilamentos de actina que separa as células durante a citocinese (M Fenech *et al.*, 2011; Michael Fenech, 2007). Dessa forma, são observadas células binucleadas (M Fenech *et al.*, 2011; Michael Fenech, 2007) que podem revelar instabilidade celular pela presença de anomalias como pontes nucleocitoplasmáticas (NPC), brotos nucleares (BN) e micronúcleos (MN), além de possibilitar investigar a morte celular por apoptose e necrose (M Fenech *et al.*, 2011; Michael Fenech, 2006).

Nossos resultados demonstraram que as CEM do TA da face e do abdômen estudadas neste trabalho apresentam baixa frequência de anomalias nucleares, menos de 0,1% em todas as passagens, mesmo nas passagens médias e altas nas quais houve alto percentual de células positivas para γ H2AX (Terzi *et al.*, 2016). Além disso, o NDI foi 2,5 nas passagens baixas e 1,5 nas passagens altas. Isso significa que as células estavam muito proliferativas em passagens baixas e pouco proliferativas em passagens altas durante o bloqueio da citocinese pela citocalasina B. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos da curva de senescência celular e do gráfico gerado pelo total de núcleos das células coradas com DAPI.

Em nosso trabalho não visualizamos micronúcleos que resultam de fragmentos de cromossomos derivados de quebras na dupla fita do DNA ou de cromossomos inteiros devido a erros no reparo de DNA ou

de segregação dos cromossomos (M Fenech *et al.*, 2011; Michael Fenech, 2007). Além disso, a frequência de células apoptóticas em ambas as CEM foi menor que 0,01%. As anomalias nucleares visualizadas em nossas células foram às pontes nucleocitoplasmáticas e os brotos nucleares. Ambas as anomalias são indicadores de quebra no DNA e estas sinalizadas por γ H2AX (Michael Fenech, 2006). As pontes nucleocitoplasmáticas são resultado da junção de cromossomos dicêntricos (aberrações estruturais de cromossomos pelo o qual este fica com dois centrômeros) durante a anáfase da mitose (Michael Fenech, 2007). Esses cromossomos são consequência da falha no reparo em quebras cromossômicas ou pela fusão dos telômeros (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; M Fenech *et al.*, 2011; Michael Fenech, 2006). Já os brotos podem ter várias origens, inclusive de quebras de pontes nucleoplasmáticas. Os brotos estão mais associados a condições seletivas do meio que induze à amplificação gênica (Michael Fenech, 2006). Apesar de ambas as CEM demonstrarem baixa frequência de anomalias nucleares, as CEM do TA abdominal apresentaram maior tendência para acumular estas anomalias do que as CEM do TA facial em passagens altas. A anomalia do tipo ponte nucleocitoplasmática foi estatisticamente maior nas CEM do TA abdominal nas passagens altas quando comparado com as CEM do TA facial em mesmas passagens. Esta diferença foi de aproximadamente 2 vezes. No entanto, ainda são consideradas extremamente baixas e seguras para aplicações terapêuticas (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; M Fenech *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos das análises de anomalias nucleares podem auxiliar na interpretação dos resultados obtidos da análise de γ H2AX (Olivieri *et al.*, 2015). Apesar do alto percentual de γ H2AX nas passagens médias e altas de ambas as CEM, isso poderia indicar uma intensa resposta a dano no DNA, no entanto ao relacionarmos estes resultados com os resultados obtidos pelo ensaio de CBMN pensamos que pode haver pouca quebra na dupla fita do DNA (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; Olivieri *et al.*, 2015). Caso o percentual de células com γ H2AX refletisse quebra do DNA deveria haver maior frequência de anomalias nucleares, o que foi muito baixo nas CEM de ambas as fontes de TA e em todas as passagens celulares (Michael Fenech, 2007; Kuo & Yang, 2008; Lopez *et al.*, 2012). Isto demonstra que as CEM do TA facial e do TA abdominal apresentam uma alta capacidade de lidar com danos celulares, reduzido acúmulo de instabilidade nuclear e são equiparadamente seguras para aplicações terapêuticas, principalmente se utilizadas em passagens baixas.

A alta resistência contra danos celulares visualizados neste trabalho podem estar relacionados com a notável capacidade de secreção de fatores citoprotetores das CEM do TA (T. Wang *et al.*, 2015). Esses fatores tanto podem agir de forma autócrina, ou seja, na própria célula que os secretou, como de forma parácrina agindo nas células vizinhas (B.S. Park *et al.*, 2010; T. Wang *et al.*, 2015). Acredita-se que essa secreção pode conter biomoléculas e microvesículas como exossomos ricos em RNAm, proteínas e afins que aumentam as defesas celulares contra os danos celulares e agem com anti senescência celular (B.-S. Park *et al.*, 2010). Da mesma forma que há a secreção, devemos ponderar que essas biomoléculas possam estar sendo produzidas internamente nas células e podem antes de serem secretadas agirem nelas mesmas. Assim, o perfil de secreção citoprotetor reconhecido das CEM do TA podem também sugerir que estas células naturalmente são eficientes para lidarem com agentes estressores. Ainda, aprofundando a reflexão, podemos indagar sobre a importância da origem dessas células/tecido e sua capacidade de lidar com eventos danosos.

7.4. A ORIGEM DO TA (EMBRIONÁRIA OU REGIÃO ANATÔMICA) PODE INFLUENCIAR AS PROPRIEDADES DAS CEM DESTE TECIDO SEM REDUZIR O POTENCIAL TERAPÊUTICO DE AMBAS AS CÉLULAS

O TA facial tem origem na crista neural, uma estrutura transitória durante a neurulação de vertebrados (Le Douarin & Dupin, 2003). Recentemente, inúmeros trabalhos relataram a presença de CT adultas da crista neural (CTA-CN) em vários reservatórios do corpo, principalmente a pele, folículos pilosos, ligamento periodontal e tecidos conjuntivos da região crânio/facial de mamíferos (Coura *et al.*, 2008; Kaltschmidt, *et al.*, 2012; Trainor, *et al.*, 2003). Segundo Kaltschmidt e colaboradores (2012), as CTA-CN teriam alta capacidade de autorrenovação e de diferenciação celular, superadas apenas pelas células-tronco pluripotentes embrionárias (Kaltschmidt, *et al.*, 2012). Como consequência, essas células também teriam uma alta capacidade para lidar com danos celulares, visto que quanto mais indiferenciada a CT, maiores os mecanismos para evitar acúmulos de danos celulares (Afonso Cornélio & Batistuzzo de Medeiros, 2014; Kaltschmidt *et al.*, 2012; Keyes *et al.*, 2016). Essa hipótese poderia ser também uma justificativa para o maior potencial osteogênico, eficiência de formar CFU-F, proliferação celular e a maior estabilidade nuclear durante a expansão da cultura de CEM do TA facial observados neste trabalho. Já que esses resultados foram contrários ao esperado, pois a média de

idade dos doadores do TA facial foi cerca de 30 anos a mais que os doadores do TA abdominal, seria esperado maior estabilidade nuclear nas CEM do TA abdominal. Além de doadores mais jovens, o TA abdominal é menos exposto a agentes ambientais como o frio e o sol (Jablonski & Chaplin, 2010; Panich *et al.*, 2016). Portanto, uma possibilidade que levantamos é que as CEM do TA facial possam conter características de CN.

A preocupação com a origem do tecido fonte de CEM só recentemente chamou a atenção dos pesquisadores (Choudhery *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Russo *et al.*, 2014). Choudhery e colaboradores (2015) analisaram as características de CEM isoladas de diferentes regiões do tronco e membros humanos, como: a mama, o dorso, o abdômen, os flancos, as coxas e axilas. Seus resultados mostraram que independente da origem do TA não houveram diferenças morfológicas, no perfil mesenquimal, na proliferação, na CFU-F e no potencial de diferenciação celular das CEM (Choudhery *et al.*, 2015). Já Russo e colaboradores, 2014, relataram que as CEM analisadas do TA subcutâneo abdominal, pericárdico e do timo demonstraram diferenças no rendimento, na viabilidade, no fenótipo mesenquimal, CFU-F e no potencial de diferenciação celular para fenótipos adipocíticos e osteocíticos (Russo *et al.*, 2014). No entanto, ainda são poucas as investigações sobre o efeito do TA de origem facial e abdominal humana nas propriedades das CEM. O presente trabalho é um dos primeiros e poucos que visam esta análise comparativa.

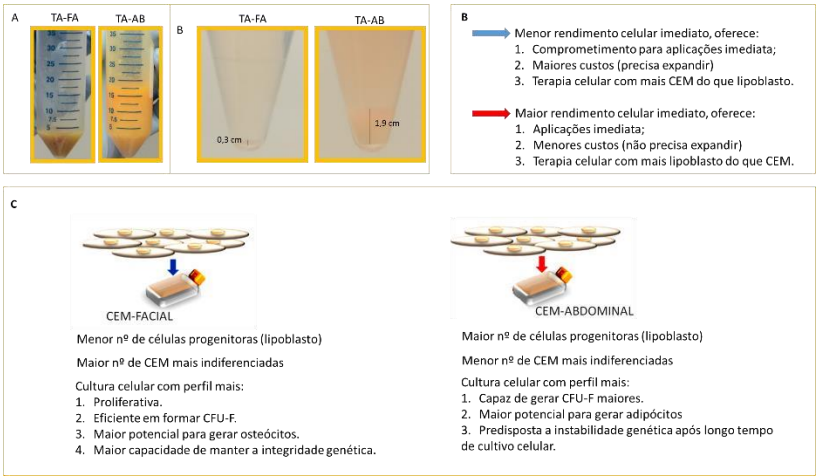
Essas distinções podem resultar de inúmeros fatores como o procedimento de extração do TA, a idade e o estado fisiológico do paciente doador do tecido, origem embrionária, exposições ao meio ambiente e a fatores endógenos e o manuseio das células em cultura (Bian *et al.*, 2016; Choudhery *et al.*, 2015). As distinções encontradas entre as células do nosso trabalho não reduzem o seu promissor efeito regenerativo dessas, no entanto podem sugerir aplicações personalizadas de acordo com o alvo terapêutico. Por causa de seu maior potencial osteogênico, as CEM do TA facial poderiam ser melhor aplicadas para tratamento de defeitos ósseos como dentes e doenças degenerativas como a osteoporose. Enquanto as CEM-TA do abdômen, devido sua abundância podem ser mais bem indicadas para tratamentos estéticos ou tratamentos que necessitam maior urgência da aplicação de CEM e que o doador/receptor tenha poucas áreas sadias para doar o TA, como os pacientes com queimaduras de 2ª e 3ª grau. Por fim, os resultados experimentais obtidos no presente trabalho fornecem fortes evidências de que as CEM-TA da face são uma fonte alternativa de

CEM para terapias celulares e apresentam propriedades que as tornam tanto ou mais eficientes terapeuticamente do que as CEM-TA do abdômen.

8. CONCLUSÃO

Em conjunto, neste trabalho concluímos as CEM-TA facial e as CEM-TA abdominal são diferentes e que a fonte do TA interfere nas características da CEM. No entanto são ambas promissoras para terapias celulares (Figura 24).

Figura 24. Esquematização da hipótese sobre as propriedades de CEM isoladas do TA facial e do TA abdominal. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que há maior rendimento de TA e de fração celular de lipoaspirados abdominais do que de rinoplastia facial (A). Em consequência disto, a fração celular do TA abdominal pode ser aplicada de forma mais imediata e menos custosa do que a fração celular do TA facial, no entanto esta última é mais rica em CEM (B). As características das CEM do TA facial e do TA abdominal diferem entre si, sugerindo uma população com mais propriedades de CEM do que as células obtidas do TA abdominal. Fonte: Fotos e imagens produzida pela autora (2017).



REFERÊNCIAS

- Afonso Cornélio, D., & Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2014). Genetic evaluation of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 36(4), 238/240 .
- Ana Belén Carrillo-Gálvez, Angélica García-Pérez, Marién Cobo, F. M. (2013). CD105 (Endoglin)-Negative Murine Mesenchymal Stromal Cells Define a New Multipotent Subpopulation with Distinct Differentiation and Immunomodulatory Capacities. *PLoS ONE*, 8(10), 1–13.
- Andreeva NV1, Zatsepina OG1, Garbuz DG1, Evgen'ev MB2, B. A. (2016). Recombinant HSP70 and mild heat shock stimulate growth of aged mesenchymal stem cells. *Cell Stress and Chaperones*, 21(4), 727–733.
- Arufe MC1, De la Fuente A, Fuentes-Boquete I, De Toro FJ, B. F. (2009). Differentiation of synovial CD-105+ human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(1), 145–155.
- Badalà, F., Nouri-mahdavi, K., & Raoof, D. A. (2008). Adipose Tissue Heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for Obesity Complications. *Computer*, 144(5), 724–732.
- Behr, B., Ko, S. H., Wong, V. W., Gurtner, G. C., & Longaker, M. T. (2010). Stem cells. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 126(4), 1163–71. <http://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181ea42bb>
- Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4), 392–402.
- Berra, C. M., Menck, C. F. M., & Di Mascio, P. (2006). Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*, 29(6), 1340–1344.
- Berry, D. C., Stenesen, D., Zeve, D., & Graff, J. M. (2013). The developmental origins of adipose tissue. *Development (Cambridge,England)*,140(19),3939–49.
- Bhang, S. H., Lee, S., Shin, J.-Y., Lee, T.-J., Jang, H.-K., & Kim, B.-S. (2014). Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(4), 862–72.
- Bian, Y., Deng, C., Li, W., Lei, Z., Li, Y., & Li, X. (2016). A Comparative Study on the Biological Characteristics of Human

- Adipose-Derived Stem Cells from Lipectomy and Liposuction. *PLoS Genetics*, 11(9), 1–16.
- Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M. C., Glavieux-pardanaud, C., Richardson, W. D., Kessaris, N., ... Dupin, E. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*, 2292, 2283–2292.
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Rubin, J. P. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International So. *Cytotherapy*, 15(6), 641–648.
- Bressan, R. B., Melo, F. R., Almeida, P. A., Bittencourt, D. A., Visoni, S., Jeremias, T. S., Trentin, A. G. (2014). EGF-FGF2 stimulates the proliferation and improves the neuronal commitment of mouse epidermal neural crest stem cells (EPI-NCSCs). *Experimental Cell Research*, 327(1), 37–47.
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287–99.
- Bydlowski, S. P., Debes, A. a., Maselli, L. M. F., & Janz, F. L. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 31, 25–35.
- Cawthorn, W. P., Scheller, E. L., & MacDougald, O. a. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *The Journal of Lipid Research*, 53(2), 227–246.
- Chau, Y.-Y., Bandiera, R., Serrels, A., Martínez-Estrada, O. M., Qing, W., Lee, M., Hastie, N. (2014). Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nature Cell Biology*, 16(4), 367–75.
- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., & Harris, D. T. (2015). Subcutaneous Adipose Tissue-Derived Stem Cell Utility Is Independent of Anatomical Harvest Site. *BioResearch Open Access*, 4(1), 131–145.
- Coelho, M., Oliveira, T., & Fernandes, R. (2013). State of the art paper Biochemistry of adipose tissue : an endocrine organ, 9(2)(Figure 1).
- Condic, M. L. (2014). What It Is and What It Is Not. *Communications of the ACM*, 00(00), 10–10.
- Coura, G. S., Garcez, R. C., de Aguiar, C. B. N. M., Alvarez-Silva, M., Magini, R. S., & Trentin, a G. (2008). Human periodontal

- ligament: a niche of neural crest stem cells. *Journal of Periodontal Research*, 43(5), 531–6.
- Dai, R., Wang, Z., Samanipour, R., Koo, K., & Kim, K. (2016). AdiposeDerived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells International*, 2016, 1–19.
- Dani, C., & Billon, N. (2012). *Adipose Tissue Biology*. (M. E. Symonds, Ed.). New York, NY: Springer New York.
- De Becker, A., & Riet, I. Van. (2016). Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World Journal of Stem Cells*, 8(3), 73–87.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–7.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1-2), 58–66.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. . . . *Nature Protocols*, 2(5), 1084–104.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, a T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–32. <http://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Fukada, S., Ma, Y., & Uezumi, A. (2014). Adult stem cell and mesenchymal progenitor theories of aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2(March), 1–9.
- Heneidi, S., Simerman, A. a, Keller, E., Singh, P., Li, X., Dumesic, D. a, & Chazenbalk, G. (2013). Awakened by cellular stress: isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. *PloS One*, 8(6), e64752.
- Hernan Chinski, Luis Chinski, Jenny Armijos, J. P. A. (2013). Rhinoplasty and its effects on the perception of beauty. *International Archives of Otorhinolaryngology*, 17(1), 47–50.
- Hisaoka, M. (2014). Lipoblast: Morphologic features and diagnostic value. *Journal of UOEH*, 36(2), 115–121.

- Hofer, E. L., Labovsky, V., La Russa, V., Vallone, V. F., Honegger, alba elizabeth, Belloc, C. G., Chasseing, N. A. (2010). Mesenchymal Stromal Cells, Colony Forming Unit Fibroblasts, From bone Marrow of Untreated Advance Breast and Lung Cancer Patients Suppress Fibroblast Colony Formation From Healthy Marrow. *Stem Cells and Development*, 19(3), 359–369.
- Huang, F., Wang, B. R., Wu, Y. Q., Wang, F. C., Zhang, J., & Wang, Y. G. (2016). Oncolytic viruses against cancer stem cells: A promising approach for gastrointestinal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(35), 7999–8009.
- Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11(1), 11–8.
- Igor, E., & Konstantinov, I. E. (2000). In Search of Alexander A. Maximow: The Man Behind the Unitarian Theory of Hematopoiesis. *Perspect Biol Med.*, 43(2), 269–276.
- Ishibashi, O., Ikegame, M., Takizawa, F., Yoshizawa, T., Moksed, M. A., Iizawa, F., Kawashima, H. (2010). Endoglin is involved in BMP2-induced osteogenic differentiation of periodontal ligament cells through a pathway independent of Smad-1/5/8 phosphorylation. *Journal of Cellular Physiology*, 222(2), 465–473.
- Jablonski, N. G., & Chaplin, G. (2010). Colloquium paper: human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 Suppl , 8962–8.
- Jeremias, T. D. S., Machado, R. G., Visoni, S. B. C., Pereima, M. J., Leonardi, D. F., & Trentin, A. G. (2014). Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration. *PloS One*, 9(2), e89542.
- Jung, Y., & Brack, A. S. (2014). Cellular mechanisms of somatic stem cell aging. *Current Topics in Developmental Biology*, 107, 405–38.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. a. (2009). Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428.
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., & Widera, D. (2012). Adult Craniofacial Stem Cells: Sources and Relation to the Neural Crest. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(3), 658–671.

- Karp, J. M., & Leng Teo, G. S. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*, 4(3), 206–16.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(5), 1294–301.
- Keyes, B. E., Liu, S., Asare, A., Naik, S., Levorse, J., Polak, L., ... Fuchs, E. (2016). Impaired Epidermal to Dendritic T Cell Signaling Slows Wound Repair in Aged Skin. *Cell*, 167(5), 1323–1338.e14.
- Kim, S. H., Bang, S. H., Park, S. A., Kang, S. Y., Park, K. D., Oh, I. U., Baek, S. Y. (2013). Character comparison of abdomen-derived and eyelid-derived mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, 46(3), 291–299.
- Kirstein, J., Morito, D., Kakihana, T., Sugihara, M., Minnen, A., Hipp, M. S., Morimoto, R. I. (2015). Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments. *The EMBO Journal*, 34(18), 2334–2349.
- Knoblich, J. A. (2008). Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell*, 132(4), 583–597.
- Kumar, P., Kumar, B., Pandey, A., & Aithal, S. (2011). Anatomical study of superficial fascia and localized fat deposits of abdomen. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 44(3), 478.
- Kuo, L. J., & Yang, L.-X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Athens, Greece)*, 22(3), 305–9.
- Langenbach, F., & Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research {& Therapy}*, 4(5), 117. <http://doi.org/10.1186/scrt328>
- Latil, M., Rocheteau, P., Châtre, L., Sanulli, S., Mémet, S., Ricchetti, M., Chrétien, F. (2012). Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nature Communications*, 3(May), 903.
- Le Douarin, N. M., Calloni, G. W., & Dupin, E. (2014). The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle*, 7(8), 1013–1019.
- Le Douarin, N. M., & Dupin, E. (2003). Multipotentiality of the neural crest. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(5), 529–36.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.

- C., Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195.
- Lee, J. Y., Chen, J. Y., Shaw, J. L., & Chang, K. T. (2016). Maintenance of Stem Cell Niche Integrity by a Novel Activator of Integrin Signaling. *PLoS Genetics*, 12(5), 1–26.
- Li, C., Wu, X., Tong, J., Yang, X., Zhao, J., Zheng, Q., Ma, Z. (2015). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, 6, 55.
- Lopez, M. F., Tollervey, J., Krastins, B., Garces, A., Sarracino, D., Prakash, A., Lunyak, V. V. (2012). Depletion of nuclear histone H2A variants is associated with chronic DNA damage signaling upon drug-evoked senescence of human somatic cells. *Aging*, 4(11), 823–42.
- Maleki, M., Ghanbarvand, F., Behvarz, M. R., Ejtemaei, M., & Ghadirkhomi, E. (2014). Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *International Journal of Stem Cells*, 7(2), 118–126.
- Martindale, M. Q., Pang, K., & Finnerty, J. R. (2004). Investigating the origins of triploblasty: “mesodermal” gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). *Development (Cambridge, England)*, 131(10), 2463–74.
- Matarasso, A., Matarasso, D. M., & Matarasso, E. J. (2014). Abdominoplasty: Classic principles and technique. *Clinics in Plastic Surgery*, 41(4), 655–672.
- Maureen Beederman, 1, # Joseph D. Lamplot, 1, # Guoxin Nan, 1, 2 Jinhua Wang, 1, 3 Xing Liu, 1, 2 Liangjun Yin, 1, 3 Ruidong Li, 1, 3 Wei Shui, 1, 3 Hongyu Zhang, 1, 3 Stephanie H. Kim, 1 Wenwen Zhang, 1, 3 Jiye Zhang, 1, 3 Yuhan Kong, 1, 3 Sahitya Dendulur, 3. (2013). BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 06(08), 32–52.
- Mizuno, H., Tobita, M., & Uysal, A. C. (2012). Concise review: Adiposederived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(5), 804–10.
- Montagner, S., & Costa, A. (2009). Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. *An Bras Dermatol*, 84(3), 263–269.
- Ogura, F., Wakao, S., Kuroda, Y., Tsuchiyama, K., Bagheri, M., Heneidi, S., Dezawa, M. (2014). Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic

- and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells and Development*, 23(7), 717–28.
- Olivieri, F., Albertini, M. C., Orciani, M., Ceka, A., Cricca, M., Procopio, A. D., & Bonafè, M. (2015). DNA damage response (DDR) and senescence: shuttled inflamma-miRNAs on the stage of inflammaging. *Oncotarget*, 6(34), 35509–35521.
- Original, A. (2010). Variações anatômicas do tecido celular subcutâneo pós-perda ponderal, 25(Figura 1), 675–678.
- Ortiz Gea, E. (2010). [Failures in the treatment of pulp injuries and pulpotomies--their causes and prevention]. *ADM; Revista de La Asociación Dental Mexicana*, 30(3), 13–8.
- Panich, U., Sittithumcharee, G., Rathviboon, N., & Jirawatnotai, S. (2016). Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging. *Stem Cells International*, 2016. 20(2), 11-14.
- Park, A., Kim, W. K., & Bae, K.-H. (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(1), 33–42.
- Park, B.-S., Kim, W.-S., Choi, J.-S., Kim, H.-K., Won, J.-H., Ohkubo, F., & Fukuoka, H. (2010). Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomedical Research*, 31(1), 27–34.
- Pawitan, J. A. (2014). Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in 10.1155/2014/965849 Medicine. *BioMed Research International*, 2014, 965849.
- Pera, M. F., Reubinoff, B., & Trounson, A. (2000). Human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 113, 5–10.
- Perin, E. C., Dohmann, H. F. R., Borojevic, R., Silva, S. A., Sousa, A. L. S., Mesquita, C. T., Willerson, J. T. (2003). Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, 107(18), 2294–2302.
- Pomeranec, L., Hector-Greene, M., Ehrlich, M., Globe, G. C., & Henis, Y. I. (2015). Regulation of TGF- β receptor hetero-oligomerization and signaling by endoglin. *Molecular Biology of the Cell*, 26(17), 3117–27.
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology*, 192(4), 547–56.

- Russo, V., Yu, C., Belliveau, P., Hamilton, A., & Flynn, L. E. (2014). Comparison of Human Adipose-Derived Stem Cells Isolated from Subcutaneous, Omental, and Intrathoracic Adipose Tissue Depots for Regenerative Applications. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(2), 206–217.
- Sanchez-Gurmaches, J., & Guertin, D. a. (2014). Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nature Communications*, 5(May), 4099.
- Sciences, R., & Clinic, C. (2014). Tissue Engineering and Regenerative Medicine T Issue E Nginneering And R Egenerative M Edicine Amide-Type Local Anesthetics and Human Mesenchymal Stem Cells : Clinical Implications for Stem Cell Therapy, 365–374.
- Shammas, M. A. (2011). Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(1), 28–34.
- Sharpless, N. E., & Depinho, R. A. (2004). Telomeres , stem cells , senescence , and cancer, 113(2).
- Silva, D., de Freitas Souza, B., Azevedo, C., Vasconcelos, J., Carvalho, R., Soares, M. B., & dos Santos, R. (2014). Intramyocardial transplantation of cardiac mesenchymal stem cells reduces myocarditis in a model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(4), 81.
- Sivakumar, M., Dineshshankar, J., Sunil, P. M., Nirmal, R. M., Sathiyajeeva, J., Saravanan, B., & Senthileagappan, A. R. (2015). Stem cells: An insight into the therapeutic aspects from medical and dental perspectives. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 7(Suppl 2), S361–71.
- Somoza, R. A., Welter, J. F., Correa, D., & Caplan, A. I. (2014). Chondrogenic differentiation of Mesenchymal Stem Cells: challenges and unfulfilled expectations. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 20(216), 1–50.
- Sood, J., Jayaraman, L., & Sethi, N. (2011). Liposuction: Anaesthesia challenges. *Indian Journal of Anaesthesia*, 55(3), 220–7.
- Sowa, Y., Imura, T., Numajiri, T., Takeda, K., Mabuchi, Y., Matsuzaki, Y., & Nishino, K. (2013). Adipose stromal cells contain phenotypically distinct adipogenic progenitors derived from neural crest. *PloS One*, 8(12), e84206.
- Sui, B. D., Hu, C. H., Zheng, C. X., & Jin, Y. (2016). Microenvironmental Views on Mesenchymal Stem Cell Differentiation in Aging. *Journal of Dental Research*, (145).

- Tasman, A.-J. (2007). Rhinoplasty - indications and techniques. *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery*, 6, Doc09.
- Terzi, M. Y., Izmirli, M., & Gogebakan, B. (2016). The cell fate: senescence or quiescence. *Molecular Biology Reports*, 1–8.
- Tsai, C. C., Chen, Y. J., Yew, T. L., Chen, L. L., Wang, J. Y., Chiu, C. H., & Hung, S. C. (2011). Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through downregulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood*, 117(2), 459–469.
- Tsuji, W., Rubin, J. P., & Marra, K. G. (2014). Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 312–21.
- Valluru, M., Staton, C. A., Reed, M. W. R., & Brown, N. J. (2011). Transforming growth factor-B and endoglin signaling orchestrate wound healing. *Frontiers in Physiology*, 2 NOV(November), 1–12.
- Vessoni, A. T., Muotri, A. R., & Okamoto, O. K. (2012). Autophagy in Stem Cell Maintenance and Differentiation. *Stem Cells and Development*, 21(4), 513–520.
- Visvader, J. E., & Clevers, H. (2016). SERIES ON STEM CELL BIOLOGY Tissue-specific designs of stem cell hierarchies, 18(4).
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Ho, A. D. (2008). Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PloS One*, 3(5), e2213.
- Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 21(6), 697–738.
- Wang, M.-K., Sun, H.-Q., Xiang, Y.-C., Jiang, F., Su, Y.-P., & Zou, Z.M. (2012). Different roles of TGF- β in the multi-lineage differentiation of stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 4(5), 28–34.
- Wang, T., Guo, S., Liu, X., Xv, N., & Zhang, S. (2015). Protective effects of adipose-derived stem cells secretome on human dermal fibroblasts from ageing damages. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(12), 15739–48.
- Wang, W. Z., Fang, X. H., Williams, S. J., Stephenson, L. L., Baynosa, R. C., Khiabani, K. T., & Zamboni, W. A. (2014). LidocaineInduced ASC Apoptosis (Tumescent vs. Local Anesthesia). *Aesthetic Plastic Surgery*, 38(5), 1017–1023.

- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, 19(2), 156–72.
- Xu, X., Wang, H.-Y., Zhang, Y., Liu, Y., Li, Y.-Q., Tao, K., ... Liu, X.Y. (2014). Adipose-derived stem cells cooperate with fractional carbon dioxide laser in antagonizing photoaging: a potential role of Wnt and β -catenin signaling. *Cell & Bioscience*, 4(1), 24.
- Yamashita, Y. M., Yuan, H., Cheng, J., & Hunt, A. J. (2010). Polarity in Stem Cell Division: Asymmetric Stem Cell Division in Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), a001313–a001313.
- Yokomizo, V. M. F., Benemond, T. M. H., Bressan, F. F., Sangalli, J. R., Pieiri, N. C. G., Casals, J. B., & Martins, D. S. (2011). Célulastronco derivadas de tecido adiposo : isolamento , cultivo in vitro e perspectivas de utilização em dermatologia Adipose tissue derived stem cells : isolation , in vitro culture, 3(1), 55–59.
- Young, H. E., & Black, A. C. (2004a). Adult stem cells. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 276(1), 75–102.
- Young, H. E., & Black, A. C. (2004b). Adult stem cells. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 276(1), 75–102.
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1429–1437.
- Ziebarth, A. J., Newshean, S., Steg, A. D., Shah, M. M., Katre, A. A., Dobbin, Z. C., Landen, C. N. (2013). Endoglin (CD105) contributes to platinum resistance and is a target for tumor-specific therapy in epithelial ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(1), 170–182.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., Ugarte, D. A. De, Huang, J. I., Mizuno, H., Hedrick, M. H. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells □, 13(December), 4279–4295.

ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Estudo comparativo do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais derivadas da derme e do tecido adiposo humanos e seus meios condicionados associados a um substituto dérmico no reparo tecidual cutâneo”.

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Andrea Trentin, RG: 45181543

Pesquisador participante: Priscilla Barros Delben

Telefone para contato: (48) 3721-4582

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de pesquisa “Estudo comparativo do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais derivadas da derme e do tecido adiposo humanos e seus meios condicionados associados a um substituto dérmico no reparo tecidual cutâneo”, de responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Andrea Trentin. A seguir lhe serão apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr (a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Células tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 3721-4582.

Declaramos que as normas da Resolução 466/CONEP e suas complementares serão obedecidas em todas as fases da pesquisa.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo realizar a cultura em laboratório de células-tronco derivadas da sua pele e/ou do seu tecido adiposo. Este estudo é necessário porque as mais variadas pesquisas podem ser realizadas *in vitro* com essas células, levando ao esclarecimento de muitas questões científicas e ao desenvolvimento de novas terapias.

Serão utilizados os pedaços de pele e/ou tecido adiposo subcutâneo que sobra das cirurgias plásticas. Isto não traz riscos, pois esses pequenos fragmentos que sobram normalmente são jogados fora (lixo hospitalar). A partir destes fragmentos, realizaremos culturas de células-tronco da pele e tecido adiposo sobre um biomaterial (Integra®), o qual serve de estrutura para o crescimento das células. Este estudo pretende avaliar o potencial de reparo da pele de camundongos tratados com as células-tronco derivadas da pele e do tecido adiposo, associadas ao biomaterial.

Estudos como estes são necessários, pois nos proporcionam conhecimentos que

futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias utilizando células-tronco, como por exemplo, na reconstituição de nova pele em casos de queimaduras. Reforçamos que os fragmentos de pele que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos experimentais em laboratório.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de pele e/ou tecido adiposo retirado durante a cirurgia plástica e que seria descartado, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o (a) Sr (a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, pode entrar em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o (a) Sr (a) assine esse documento.

Assinatura do pesquisador: _____

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____, RG _____, fui esclarecido(a) sobre a pesquisa "Estudo comparativo do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais derivadas da derme e do tecido adiposo humanos e seus meios condicionados associados a um substituto dérmico no reparo tecidual cutâneo".

Assinatura do paciente ou responsável: _____

Florianópolis, ____ de _____ de 2015.

ANEXO 2

Tampão de lise dos glóbulos vermelhos (RBC)

Dissolve-se o seguinte em 1 litro de ddH₂O:

- 8,26 g de cloreto de amônio (NH₄Cl)
- 1 g de bicarbonato de potássio (KHCO₃)
- 0,037 g de EDTA

Misture bem e autoclave.

Armazenar até 6 meses a temperatura ambiente ou 4 ° C

ANEXO 3

Colorações

Oil Red 0 – marcador de triglicerídeos, lipídeos e algumas lipoproteínas

Solução-mãe:

- Vermelho de óleo 0 (Oil red 0) - 3,75 g
- Álcool isopropílico 99° - 100 mL

Solução de uso:

- Solução-mãe de Oil Red 0 - 3 mL
- Água destilada - 6,67 mL

Vermelho de alizarina (Schrotter)

- Vermelho de Alizarina S - 3 g
- Água destilada - 100 mL

Coloração de Mallory

- Azul de anilina - 0,5g
- Orange G - 2 g
- Ácido Fosfotúngstico - 1 g
- água destilada - 100 mL